

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2013 – Mei 2014 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang dan Laboratorium Kimia Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, gelas objek, gelas kimia (50 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL), labu takar (10 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL), pipet tetes, gelas ukur 100 mL, pengaduk kaca, mikro pipet (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L), rak tabung reaksi, penangas air, waterbath, stirer, eppendorf, tabung polipropilen, lemari pendingin, pH meter digital, penjepit, seperangkat alat sentrifugasi, inkubator, vortex, spektrofotometri UV, mikroskop cahaya, *autoclave*.

4.2.1 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), Indometasin dengan dosis 15 mg/kgBB, ekstrak etanol akar seledri dosis 1000 mg/ 100 ml dan 3000 mg/ 100 ml, minyak jagung PBS- Azida, PFA 37%, KCl, KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄.H₂O, NaOH, PBS-*Tween* : PMSF (*Poly Methyl Sulfonyl Fluoride*) 1:9, pasir kwarsa, Etanol 70%, Etanol 80%, Etanol

90%, Etanol 95%, air hangat, obyek glass, Tris-HCl, kasein, tirosin, buffer fosfat pH 7, parafin, akuades steril, Tri Chloro acetic Acid (TCA), PFA 4%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 95%, larutan PBS, PFA 4%, 3% H₂O₂, *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Mayer Hematoxylen*, *Eosin*, *Entellan*, dan *Xylol*.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 8-12 minggu. Berat badan tikus antara 150-250 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

$$t(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk perlakuan sejumlah 4 kelompok maka minimal dilakukan 5 kali ulangan dalam setiap kelompok sehingga total tikus yang dibutuhkan 20 ekor.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol sehat, kelompok sakit IBD, kelompok terapi dosis 100 mg/KgBB dan kelompok terapi dosis 300 mg/KgBB. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor tikus sebagai ulangan.

Tabel 4.1 Kelompok perlakuan tikus

Kelompok Tikus	Perlakuan
A (Kontrol)	Tikus kontrol, yaitu tikus tanpa perlakuan hanya diberi minum dan ransum basal
B (Indometasin)	Kelompok tikus diberikan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB tanpa diberikan terapi
C (Terapi Dosis 100 mg/KgBB)	Kelompok tikus diberikan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dan diberikan terapi ekstrak etanol akar seledri dosis 100 mg/KgBB sebanyak 2 ml selama 14 hari dengan cara sonde lambung
D (Terapi Dosis 300 mg/KgBB)	Kelompok tikus diberikan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dan diberikan terapi ekstrak etanol akar seledri dosis 300 mg/KgBB sebanyak 2 ml selama 14 hari dengan cara sonde lambung

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Pemberian Indometasin dan ekstrak etanol akar seledri

Variabel tergantung : Aktivitas enzim protease dan gambaran histopatologi

Variabel kendali : Tikus strain Wistar jantan umur 8-12 minggu dan berat badan 150-250 gram

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Percobaan

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransum basal pada semua tikus. Komposisi ransum basal disusun berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin, dan air 12%. Tikus dibagi dalam 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus.

Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm, dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Kandang terbuat dari *plastik atom*.

4.6.2 Persiapan Hewan Model IBD dengan Indometasin

Dosis indometasin yang diberikan pada tikus adalah 15 mg/kg BB. Indometasin diberikan secara peroral. Sebelum diberikan pada tikus, indometasin dilarutkan terlebih dahulu dengan minyak jagung. Minyak jagung ini berfungsi sebagai pelarut. Indometasin yang sudah dihitung dosisnya, ditambah dengan minyak jagung. Setelah itu divortex untuk melarutkan indometasin. Kemudian indometasin diberikan ke tikus secara per oral sebanyak 0,2 ml. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Perhitungan dosis secara rinci dijelaskan pada lampiran 2.

4.6.3 Tata Laksana Pemberian Ekstrak Etanol Akar Seledri Per Oral

Dosis pemberian ekstrak etanol akar seledri yaitu 100 mg/KgBB dan 300 mg/KgBB. Masing – masing kelompok terapi terdapat 5 ekor tikus. Ekstrak etanol akar seledri disondekan sebanyak 2 ml pada tikus setiap pagi selama 14 hari.

4.6.4 Pengambilan Organ Jejunum

Pengambilan organ jejunum pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-15 setelah seluruh proses adaptasi tikus, pemberian indometasin, dan pemberian terapi ekstrak etanol akar seledri selesai dilakukan. Pada pengambilan organ proses pertama yang dilakukan adalah dislokasi hewan coba pada bagian leher. Kemudian Tikus ditelentangkan pada papan pembedahan. Kemudian dilakukan pembedahan pada bagian perut. Kemudian diambil bagian jejunumnya dan dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dingin. Kemudian jejunum dimasukkan ke dalam larutan *Phosphate Buffer Saline*-azida (PBS-azida) pH 7,4 untuk menjaga protein dalam organ agar tidak rusak dan larutan *paraformaldehid* 4% (PFA) untuk menjaga atau mengawetkan jaringan agar tidak lisis.

4.6.5 Isolasi Protease

Isolasi Protease pada Organ jejunum dilakukan dengan dipotong kecil-kecil jejunum dengan menggunakan gunting bedah dan ditimbang sebesar 0,5 gram, kemudian ditambahkan larutan PBS-Tween : PMSF (9 : 1) sebanyak 1 mL, lalu ditambah sedikit pasir kuarsa, dan digerus dengan mortar dingin yang diletakkan diatas blok es. lalu dilakukan homogenat dengan ditambah larutan PBS-Tween : PSMF (9 :1) sebanyak 2 mL dan dipindahkan ke dalam tabung polipropilen yang

telah disterilisasi dengan *autoclave*. Kemudian dihomogenkan dengan alat getar vorteks selama 10 menit, disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan disentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm). Setelah itu supernatannya diambil dan ditambahkan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama 24 jam hingga terbentuk endapan. kemudian disentrifugasi selama 15 menit (10.000 rpm), dan diambil endapannya dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Dan yang terakhir endapan ditambah dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5 dingin dengan perbandingan volume 1:1 (Aulanni'am, 2004).

4.6.6 Penentuan Aktivitas Protease

4.6.6.1 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Pada pembuatan kurva buku tirosin pertama disiapkan 10 labu ukur dan masing-masing diisi larutan baku tirosin dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ppm. Setelah itu ditambah akuades sampai tanda batas, kemudian tabung ditutup dengan aluminium foil lalu dikocok. Selanjutnya diukur serapannya pada masing-masing konsentrasi larutan baku pada λ maksimal = 275 nm. Blanko yang digunakan adalah akuades. Secara rinci dijelaskan pada lampiran 4. (Kumar & Vats, 2010).

4.6.6.2 Pengukuran Aktivitas Protease Hasil Isolasi dari Jejunum

Pada pengukuran Aktifitas Protease Langkah awal yang harus dilakukan adalah mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200 μ L, 300 μ L larutan buffer fosfat pH 7 dan 100 μ L enzim protease dan didiamkan pada suhu 37°C di atas inkubator selama 60 menit. Lalu ditambahkan 400 μ L larutan TCA 4% kemudian didiamkan pada suhu 27°C (suhu kamar) selama 30 menit. Selanjutnya diputar

dengan alat sentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit. Lalu supernatan diambil 100 μ L dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan bufer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya pada λ maks tirosin sebesar 275 nm. Blanko yang digunakan dibuat dengan prosedur sama dengan penentuan aktivitas, tetapi untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim.

Berdasarkan metode Aulanni'am (2004) Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{pq} \times fp$$

Dimana :
v = volume total sampel (mL)
q = waktu inkubasi (mL)
f_p = faktor pengenceran
p = jumlah enzim (mL)

4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi

Organ jejunum diambil lalu dicuci dengan NaCl fisiologis 0,96%. Setelah itu secara berurutan dilakukan fiksasi, dehidrasi dan infiltrasi, penjernihan, infiltrasi paraffin, *embedding*, *sectioning*, penempelan di gelas objek, serta pewarnaan HE (*Hematoxylin - Eosin*) dan siap dievaluasi. Secara rinci dijelaskan pada Lampiran 3.

4.6.7.1 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histopatologi jejunum dilakukan menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan perbesaran 100x sampai perbesaran 400x yang ditampilkan dilayar monitor. Gambaran histopatologi yang diamati adalah kerusakan vili dan infiltrasi sel-sel inflamasi.

4.7 Analisis Data

Analisa data histopatologi dilakukan secara deskriptif sedangkan analisa data aktifitas protease dilakukan dengan ragam ANOVA untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dan uji lanjutan BNJ untuk membandingkan seluruh pasangan rata-rata perlakuan (Kusriningrum, 2008).

