

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2014 – Maret 2015 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan jenis kelamin jantan strain Wistar berumur 8-12 minggu dengan berat badan antara 150-200 gram. Proses adaptasi dengan kondisi laboratorium (aklimatisasi) dilakukan selama tujuh hari. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Kusriningrum, 2008):

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok sehingga total hewan coba yang diperlukan sebanyak 20 ekor.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan sederhana dimana hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok secara acak (Tabel 4.1). Setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus dengan pemberian perlakuan berbeda-beda. Kelompok 1 adalah tikus yang tidak diberi perlakuan sebagai kontrol negatif. Kelompok 2 adalah tikus yang diberi indometasin sebagai kontrol positif. Kelompok 3 adalah tikus yang diinduksi indometasin kemudian diterapi menggunakan ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata L.*) dengan dosis 500 mg/kg BB. Kelompok 4 adalah tikus yang diinduksi indometasin kemudian diterapi menggunakan ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata L.*) dengan dosis 750 mg/kg BB. Kelompok 5 adalah tikus yang diinduksi indometasin kemudian diterapi menggunakan ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata L.*) dengan dosis 1000 mg/kg BB.

Tabel 4.1. Rancangan kelompok penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan			
	1	2	3	4
Ekspresi iNOS dan Profil Protein				
Kelompok 1 (kontrol negatif)				
Kelompok 2 (kontrol positif)				
Kelompok 3 (terapi 500 mg/kg BB)				
Kelompok 4 (terapi 750 mg/kg BB)				
Kelompok 5 (terapi 1000 mg/kg BB)				

4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel Bebas : Induksi indometasin dan dosis ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata* L).

Variabel tergantung : Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan Profil Protein pada lambung.

Variabel kendali : Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan Strain Wistar berumur 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram, pakan tikus, dan kondisi eksperimental (lingkungan kandang, suhu, dan kelembaban).

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, spuit 5 ml, spuit 1 ml, gunting, objek glass, scalpel, mortar, microtube, water bath 100°C, alat bedah, vortex, kertas saring, micropipet, tabung reaksi, cawan petri, tabung erlenmeyer, corong kaca, tabung ependorf, alat sentrifugasi, *cover glass*, alat *sonikasi*, *Freezer*, mikroskop, dan peralatan elektroforesis.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), indometasin, minyak jagung, kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.), larutan *PBS-Tween*, larutan *Tris-HCL*, *lower gel buffer*, (LGB), *upper gell buffer* (UGB), T-Acryl, *ammonium persulphate* (APS), *tetramethyl ethylene diamine* (TEMED), *reducing sampel buffer* (RSB), *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 12%, fosphat buffer saline (PBS),

paraformaldehida acid (PFA), aquades, Na Phys, TCA 100 %, antibodi primer (*Anti rat iNOS*), Dako LSAB (*labeled streptavidin biotin*) system-HRP (berisi *anti rabbit IgG biotin labeled* dan Strepto-avidin peroksidase), NaCl fisiologis 0,9%, alkohol, parafin, xylol, alkohol absolut, dan metanol.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba (*Rattus norvegicus*)

Tikus yang digunakan untuk penelitian pertama-tama diaklimatisasi selama tujuh hari agar beradaptasi dengan lingkungan laboratorium. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus tiap kandang. Kandang tikus terbuat dari bahan *stainless steel*. Suhu optimum untuk kandang tikus adalah 22-24 °C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup. Kandang tikus harus berlokasi di tempat yang tenang, sehingga tikus tidak stres. Tikus di beri pakan ransum basal yang disusun berdasarkan AOAC (2005) yang mengandung karbohidrat, protein, lemak, vitamin dan air.

4.6.2 Pembuatan Hewan Model IBD dengan Induksi Indometasin

Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) di induksi indometasin secara per oral dengan dosis 15mg/kg BB tikus berdasarkan Aulani'am (2012). Tikus yang digunakan rata-rata memiliki berat badan 160 gram. Dosis indometasin yang diberikan pada setiap tikus adalah 2,4 mg/tikus. Indometasin dilarutkan terlebih dahulu menggunakan minyak jagung sebelum diinduksikan pada tikus. Adapun perbandingan pelarutnya yaitu 4 ml minyak jagung dengan 45 mg indometasin (Bures,2011).

Perhitungan dosis indometasin dan minyak jagung yang diberikan secara per oral adalah sebagai berikut:

Kebutuhan Indometasin:

$$15 \text{ mg/kg BB} \times 0,16 \text{ kg} = 2,4 \text{ mg/tikus}$$

Kebutuhan total indometasin dan pelarut:

$$\frac{2,4 \text{ mg}}{45 \text{ mg}} \times 4 \text{ ml} = 0,213 \text{ ml/tikus}$$

Jadi total volume indometasin dengan pelarut yang diinduksikan pada tikus yaitu 0,213 ml/tikus. Indometasin dihomogenkan dengan pelarut minyak jagung menggunakan vorteks kemudian diinduksikan pada tikus menggunakan sonde dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil induksi indometasin dapat mengakibatkan kerusakan sel-sel pada lambung.

4.6.3. Penentuan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata* L.)

Ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.) dibuat berdasarkan metode Gupta (2006). Daun kamboja dikeringkan dengan cara dipotong kecil lalu dihilangkan kandungan airnya terlebih dahulu selama 4 jam pada oven dengan suhu 50-70°C. Setelah daun kering, yaitu dengan kandungan air kurang dari 3%, kemudian daun dikeluarkan dari oven dan diangin-anginkan selama 30 menit. Setelah itu, daun dihaluskan dengan cara diblender atau ditumbuk biasa. Sampel disimpan ditempat kering sebelum digunakan. Daun yang sudah dihaluskan menyerupai tepung selanjutnya diekstrak dengan menggunakan metode maserasi. Adapun langkah kerjanya yaitu (Gupta, 2006):

1. Daun kamboja putih yang telah dikeringkan, ditimbang dengan berat 200 gram.
2. Daun kamboja putih kering kemudian dimasukkan ke dalam beker gelas dan dituangkan metanol dengan perbandingan (1 : 3).
3. Bahan tersebut kemudian direndam dan didiamkan pada suhu kamar minimal 2 x 24 jam, dengan sesekali diaduk.
4. Setelah hitungan waktu 2 x 24 jam, bahan disaring menggunakan kertas saring whatman no. 40 dan metanol yang diperoleh dilakukan evaporasi untuk menghilangkan sisa pelarut. Sisa dari metanol yang terdapat pada bahan di oven pada suhu 40 -50°C, sampai bahan benar-benar tidak mengandung pelarut.

Penentuan dosis ekstrak metanol daun kamboja (*Plumeria acuminata* L.) berdasarkan penelitian Gupta (2006), yaitu 500 mg/Kg BB – 2000 mg/Kg BB. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan dosis 500 mg/Kg BB, 750 mg/Kg BB dan dosis 1000 mg/Kg BB sebagai dosis eksperimental untuk terapi IBD (Lampiran 4).

4.6.4 Pemberian Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata* L.)

Pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja dilakukan pada tikus kelompok C, D dan E. Metode pemberian volume terapi per oral tiap ekor tikus berdasarkan metode yang diterapkan Bekow and Baumans (2003) yaitu sebanyak 2 ml pada kelompok tikus (C) terapi ekstrak metanol *Plumeria acuminata* L. dosis 500 mg/kg BB, kelompok tikus (D) ekstrak metanol

Plumeria acuminata L. dosis 750 mg/kg BB dan kelompok tikus (E) ekstrak metanol *Plumeria acuminata L.* dengan dosis 1000 mg/kg BB yang diberikan 24 jam setelah induksi indometasin. Pemberian terapi ekstrak metanol *Plumeria acuminata L.* dilakukan selama 2 minggu berturut-turut (Gupta, 2006).

4.6.5 Pengambilan Organ Lambung

Pengambilan organ lambung pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-16 setelah seluruh perlakuan dilakukan. Prosedur pertama yang dilakukan untuk pengambilan organ lambung adalah hewan coba di-euthanasi dengan cara dislokasi leher kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diletakkan secara rebah dorsal kemudian dilakukan pembedahan pada bagian abdomen. Organ lambung kemudian diisolasi dan dipotong pada bagian tengah. Organ lambung yang telah dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9%, kemudian dimasukkan dalam larutan *Phospate Buffer Saline*-azida (PBS-azida) pH 7,4 dan sebagian lagi dimasukkan pada larutan formaldehyde (PFA) 10%.

4.6.6 Penentuan Ekspresi iNOS

4.6.6.1 Pembuatan Preparat Histopatologi Organ Lambung

Pertama organ lambung direndam dalam larutan formaldehyde 10%. Selanjutnya direndam dalam etanol 70% selama 24 jam, lalu dipindahkan dalam etanol 80% selama 2 jam, etanol 90% selama 20 menit, etanol 95% selama 20 menit dan etanol absolut selama 20 menit, langkah ini dilakukan sebanyak 3 kali. Selanjutnya organ lambung dipindahkan ke larutan xylol

selama 20 menit sebanyak 2 kali. Parafin dicairkan pada suhu 60-63°C. Organ lambung dimasukkan dalam parafin cair yang dituang ke dalam wadah selama 30 menit. Setelah beberapa saat parafin akan memadat dan organ lambung berada dalam blok parafin. Langkah selanjutnya adalah proses pemotongan dengan ketebalan 5 µm. Irisan jaringan yang telah berbentuk pita kemudian ditempelkan pada gelas objek serta menggunakan pewarnaan HE. Skema kerja pembuatan preparat histologi organ lambung (Lampiran 7).

4.6.6.2 Ekspresi iNOS dengan Pewarnaan Imunohistokimia Organ Lambung

Preparat lambung direndam kedalam xylol I, xylol II, etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%), dan aquadest secara berurutan dimana masing-masing direndam selama 5 menit, kemudian dicuci dalam PBS selama 3 x 5 menit selanjutnya hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% selama 20 menit, dicuci dengan PBS selama 3 x 5 menit dan direndam dalam 5% BSA dalam PBS selama 30 menit dan dicuci dalam PBS selama 3 x 5 menit.

Preparat kemudian direaksikan dengan antibodi primer (*Anti-rat iNOS*) selama 24 jam dengan suhu 4°C dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Berikutnya direaksikan dengan antibodi sekunder berlabel biotin (*Goat anti rat Ig G biotin labeled*) selama 1 jam dengan suhu ruang. Preparat kemudian dicuci kembali dengan PBS selama 3 x 5 menit. Ditambahkan SA-HRP selama 40 menit dan dicuci dengan PBS 3 x 5 menit. Substrat DAB ditambahkan dan inkubasi selama 10 menit lalu dicuci dengan PBS 3 x 5 menit. *Counterstain* dilakukan dengan *Hematoxylen* selama 5 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan air

mengalir, dikering anginkan dan terakhir *mounting* dengan *entellan* dan pengamatan dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400x. Hasil pengamatan kemudian difoto pada 5 lapang pandang. Hasil foto dari mikroskop kemudian diproses menggunakan *software Imunoratio* untuk mengamati perubahan ekspresi iNOS yang ditandai dengan perubahan persentasi luas daerah yang terwarnai.

4.6.7 Penentuan Gambaran Profil Protein

4.6.7.2 Isolasi Protein

Isolasi protease dilakukan dengan menghancurkan sampai halus organ lambung. Organ lambung pertama-tama ditimbang dengan berat 0,5 gram lalu dihaluskan menggunakan mortar steril dingin dengan bantuan pasir kuarsa serta ditambah 1 ml larutan *PBS-Tween: PMSF* (9 : 1). Setelah itu homogenat ditambahkan lagi dengan larutan *PBS-Tween : PSMF* (9 :1) sebanyak 2 mL dan dipindahkan ke dalam tabung polipropilen/ependorf yang telah disterilisasi menggunakan *autoclave*. Langkah selanjutnya yaitu sonikasi dengan sonikator selama 10 menit kemudian disentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm). Supernatan yang terbentuk diambil untuk dipindahkan ke tabung ependof baru dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 lalu dibiarkan selama satu malam hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifugasi selama 15 menit (10.000 rpm), diambil endapannya dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah dengan larutan 0,02 M *Tris-HCl* pH 6,5 dingin dengan perbandingan volume 1:1 (Pertiwi, 2014).

4.6.7.2 Persiapan Gel

Langkah pertama pada pembuatan gel elektroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) yaitu dengan membuat dua plat kaca dengan jarak antar plat kurang lebih 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu get tempat sampel (*Stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*Separating gel*). Pembuatan *separating gel* dilakukan dengan melarutkan *Lower Gel Buffer* (LGB), T-Acryl, *Ammonium Persulphate* (APS), dan *Tetramethyl Ethylene Diamine* (TEMED) dalam aquades steril. Campuran tersebut kemudian dituangkan ke dalam plat tempat lapisan gel menggunakan *micropipet* dan dibiarkan selama 10-30 menit hingga terbentuk gel. Langkah berikutnya yaitu menuangkan *stacking gel* diatas *separating gel* yang telah memadat sambil dipasang sisir hingga terbentuk gel berikut sumurannya. *Stacking gel* dibuat dari *Upper Gell Buffer* (UGB), T-Acryl, APS, dan TEMED yang dilarutkan dalam aquades steril. Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati-hati dan plat dipasang pada alat elektroforesis, lalu dituangkan larutan *running buffer* pada seperangkat alat elektroforesis (Thermo, 2012).

4.6.7.3 Injeksi Sampel dan *Running*

Ekstrak kasar hasil isolasi dari organ lambung diambil sebanyak 150 μL , lalu ditambahkan 150 μL *Reducing Rampel Buffer* (RSB), dan dipanaskan pada pemanas air dengan temperatur 100° C selama 3 menit. Setelah dingin, sampel dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 20 μL tiap lubang sumur, dimana salah satu sumuran gel diisi dengan protein

standar marker. Langkah selanjutnya yaitu *running* dengan arus listrik sebesar 30 mA dan 130 V selama 1-2 jam. Proses ini dihentikan apa bila warna penanda biru berada kurang lebih 0,5 cm dari batas bawah plat gel.

4.6.7.4 Perlakuan Setelah *Running*

Setelah proses *running*, dilakukan proses pewarnaan dengan cara merendam gel dalam larutan *staining* selama 30-60 menit lalu dikocok menggunakan *shaker*. Penghilangan warna dilakukan dengan cara merendam gel ke dalam larutan *destaining* sambil dikocok menggunakan *shaker* sampai gel menjadi jernih.

4.6.7.5 Penentuan Berat Molekul

Perbandingan hasil elektroforesis sampel dengan marker protein dapat digunakan untuk mengetahui jenis-jenis protein dalam ekstrak kasar enzim tersebut. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai R_f dari masing-masing pita, dimana:

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal (cm)}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal (cm)}}$$

Kemudian dibuat kurva standar dengan harga R_f sebagai sumbu X dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu Y, lalu diplotkan mobilitas dan berat molekul protein yang akan dicari sehingga dapat diketahui berat molekulnya.

4.7 Analisis Data

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah profil protein dan ekspresi iNOS. Profil protein diamati secara kuantitatif deskriptif dan ekspresi iNOS diamati secara kuantitatif menggunakan *software Imunoratio*. Data yang diperoleh dianalisa dengan uji ANOVA menggunakan Microsoft Excel 2010 dan SPSS 2.1 for Windows. Jika terdapat perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata BNJ $\alpha = 5\%$ untuk mengetahui terapi yang paling efektif untuk menurunkan ekspresi iNOS (Kusriningrum, 2008).

