

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2016 – Juli 2016 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya - Malang.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), Ovalbumin (Sigma-Aldrich, 950512), AlOH_3 , Phosphat Buffer Saline (PBS), Paraformaldehyde Acid (PFA) 10%, Aquades, LPS 1435/1449 dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Astarte Biologics), TCA 100%, HCl, Na-Thio 1%, NaCl fisiologis 0,9%, alkohol 70%, etanol 80%, 90 dan 95%, etanol absolut, xylol, parafin, aquades, DAB (*Diamano bezidine*) Chromogen antibodi primer (antiRatIL-1), Tris HCL.

4.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bak pemeliharaan hewan coba, alat bedah, cawan petri, gelas objek, labu ukur (10 ml dan 1000 ml), pengaduk kaca, mikro pipet (10 μL , 20 μL , 200 μL , 1000 μL), microtube, mortar, lemari pendingin, autoklaf, Omron CompAir Compressor Nebulizer, tisu, gloves, masker, *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, vortex, *disposable syringe* 23 G 1 mL, spuit, sentrifugator, sonikator, mikroskop timer dan seperangkat alat elektroforesis.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan strain Wistar betina, berat badan 150-250 g berumur 8 – 12 minggu yang didapatkan dari Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya – Malang. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

Tabel 4.2. Rancangan penelitian

| Variabel yang diamati | Ulangan | | | |
|--------------------------------------|---------|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Aktifitas Protease dan Ekspresi IL-1 | | | | |
| Kelompok A (kontrol negatif) | | | | |
| Kelompok B (kontrol positif) | | | | |
| Kelompok C (25 mg/kg BB) | | | | |
| Kelompok D (50 mg/kg BB) | | | | |
| Kelompok E (75 mg/kg BB) | | | | |

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana dimana subyek dibagi menjadi 5 kelompok secara random. Tiap kelompok terdiri dari 4 tikus. Kelompok 1 adalah tikus sehat (kontrol negatif), kelompok 2 adalah tikus dengan pemberian OVA + LPS (kontrol positif), sedangkan kelompok 3, 4 dan 5 diberi OVA+LPS+ ekstrak daun sirih merah dengan dosis masing-masing sebesar 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB serta 75 mg/kg BB (dengan rata-rata bobot per ekor 200 gram).

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- Variabel bebas : Ekstrak daun sirih merah, Ovalbumin dan Lipopolisakarida
- Variabel tergantung : Aktifitas Protease dan Ekspresi IL-1
- Variabel kendali : Tikus (jenis kelamin, berat badan, umur, pakan) dan lingkungan

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian diaklimatisasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransum basal berisikan serat (5%), protein (20%), dan lemak (5-10%). Pakan tikus bisa berbentuk serbuk atau pelet dan harus diberikan secara teratur. Rata-rata konsumsi pakan tikus perhari (5 g/100 g BB/Hari) dan diberikan air minum adlibitum.

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

4.6.2 Tatalaksana Sensitasi Alergi dengan Ovalbumin

Perlakuan sensitasi alergi dilakukan dengan injeksi ovalbumin (Sigma-Aldrich) 10 µg yang diemulsi 1,5 mg Al(OH)₃ dalam 200µl PBS (phosphate buffer saline) pada tikus mulai hari ke-0 dan 14 secara intra peritoneal (Cornad *et al.*, 2009). Selanjutnya sensitasi OVA dilakukan secara inhalasi. Pemaparan OVA aerosol dilakukan dalam tabung transparan yang dihubungkan dengan Omron CompAir Compressor Nebulizer pada hari ke 21, dilakukan dengan melarutkan OVA dalam NaCl steril sebanyak 1 mg/ml selama 20 menit.

4.6.3 Tatalaksana Injeksi Lipopolisakarida

Stephanie *et al.*, (2002) dan Utomo (2012) menyatakan induksi lipopolisakarida (LPS) dilakukan secara intrasulkuler dengan dosis 1 µg/ml pada sulkus gingiva molar rahang atas kiri tikus. Lipopolisakarida yang digunakan adalah LPS1435/1450 dari *Porphyromonas gingivalis* (Astarte Biologics) yang berfungsi sebagai agen infeksi rongga mulut dan memodulasi respon imun. Injeksi LPS intrasulkuler dilakukan pada hari ke 10 dan 11 secara berturut-turut.

4.6.4 Dosis Ekstrak Daun Sirih Merah

Terapi pemberian ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) diberikan pada hewan coba kelompok C, D dan E. Dosis pemberian terapi pada kelompok C sebesar 25 mg/kg BB, kelompok D sebesar 50 mg/kg BB dan kelompok E sebesar 75 mg/kg BB. Pemberian ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) diberikan secara per oral selama 14 hari yang di mulai pada hari ke 22.

4.6.5 Euthanasi dan Pengambilan Organ Paru

Pada penelitian ini tikus kelompok A dan B satu per satu didislokasi pada bagian leher di hari terakhir perlakuan induksi Ovalbumin, sedangkan tikus kelompok C, D dan E satu per satu didislokasi pada bagian leher dengan diposisikan rebah ventral terlebih dahulu di hari terakhir pemberian terapi ekstrak daun sirih merah. Dislokasi tulang leher pada tikus akan menyebabkan tikus mati yang kemudian tikus siap dibedah untuk diambil parunya, dengan cara pembedahan pada bagian abdomen hingga ke thorax memotong kedua sisi sternum sehingga organ paru dapat terlihat, kemudian organ paru dicuci dalam

NaCl fisiologis 0,9%, dan direndam di dalam larutan Phosphat Buffer Saline (PBS) yang kemudian disimpan dalam *freezer* serta sebagian lainnya direndam di dalam larutan PFA 10% disimpan di dalam suhu ruang.

4.6.6 Perhitungan ekspresi IL-1

Organ yang sudah difiksasi menggunakan PFA 10%, didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dari konsentrasi 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam, etanol 90%, 95% dan etanol absolut selama 20 menit. Kemudian dilakukan penjernihan dengan cara merendam jaringan dalam larutan xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit. Infiltrasi dan embeeding dengan menggunakan parafin cair pada inkubator bersuhu 58 – 60°C, lalu dilakukan trimming dengan cara cetakan dijepit dalam mikrotom dan jaringan dipotong dengan ketebalan 5µm. Sediaan disimpan dalam inkubator suhu 38 – 40°C 24 jam dan kemudian dilakukan imunohistokimia (Muntiha, 2001).

Preparat paru direndam kedalam xylol I, xylol II, etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, dan 70%), dan akuades secara berurutan (masing – masing 5 menit). Kemudian dicuci dengan air mengalir. Ditetaskan *peroxidase block* selama 5 menit. Kemudian dicuci dengan PBS selama 2 x 5 menit. Preparat diinkubasi dalam protein block selama 5 menit dan dicuci dalam PBS selama 2 x 5 menit. Preparat selanjutnya direaksikan dengan antibodi primer (anti Rat IL-1) selama 24 jam. Lakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 2 x 5 menit. Kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder berlabel biotin (*Post Primary*) selama 30 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 2 x 5 menit.

Preparat selanjutnya diinkubasi dengan polimere selama 30 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 2 x 5 menit. Ditetesi dengan DAB (Diamano bezidine) Chromogen dengan pengenceran 1 : 20 selama 5 menit. Dicuci dengan aquades. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan hematoxylen selama 5 menit. Dicuci dengan air mengalir. Dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Tahapan terakhir di mounting dengan etillen dan ditutup dengan *cover glass*. Lalu diamati menggunakan mikroskop. Data dokumentasi hasil pengamatan mikroskop diunggah dalam software *immunoratio* sehingga didapatkan hasil perhitungan presentase area dari tiap kelompok perlakuan.

4.6.7 Pengujian Aktifitas Protease

Pengujian aktivitas protease meliputi pembuatan larutan stok tirosin 500 ppm dengan cara 0,025g tirosin dilarutkan dalam 25 mL akuades dan diaduk dengan pengaduk magnetik dan dipindahkan dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Pembuatan larutan baku tirosin menggunakan 4 mL larutan baku tirosin 500 ppm yang dimasukkan dalam labu ukur 100mL dan diencerkan hingga tanda batas. Larutan baku 20 ppm dipipet berurutan 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 mL dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Penentuan panjang gelombang maksimum tirosin dengan 20 ppm diukur absorbansinya pada λ maksimum tirosin. Pembuatan kurva baku tirosin diperoleh dari larutan baku tirosin 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm dimasukkan dalam eppendorf dan diukur absorbansinya pada λ maksimum tirosin 200-300 nm. Pembuatan larutan kasein dengan 0,025g kasein yang dilarutkan dalam 25 mL akuades dan diaduk dengan

pengaduk magnetik lalu dipindahkan kedalam labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Pembuatan larutan blanko dengan 200 μ L dan ditambahkan 300 μ L larutan buffer fosfat pH 7 dan ditambahkan 100 μ L ekstrak kasar protein dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit dan ditambahkan 400 μ L larutan TCA 4% kemudian didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit dan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit kemudian diambil supernatan dan dipipet 100 μ L, ditambahkan buffer fosfat 5 kali volume sampel dan diukur serapannya pada λ maksimum tirosin. Pengukuran aktivitas protease dilakukan dengan larutan kasein 500 rpm yang diambil 200 μ L ditambahkan 300 μ L buffer fosfat pH 7 ditambahkan dengan 100 μ L ekstrak kasar protein dan diinkubasi dalam suhu 37°C selama 60 menit dan ditambahkan 400 μ L larutan TCA 4% kemudian didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit dan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit kemudian diambil supernatan dan dipipet 100 μ L, ditambahkan buffer fosfat 5 kali volume sampel dan diukur serapannya pada λ maksimum tirosin nm. Blanko yang digunakan dibuat dengan prosedur sama dengan penentuan aktivitas. Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan berdasarkan metode Walter (1984) menggunakan rumus :

$$\text{Aktifitas enzim} = \frac{\text{Tirosin}}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times \text{fp}$$

Dimana :

v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi (menit)

fp= faktor pengenceran

p = jumlah enzim (mL)

4.7 Analisa Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah perubahan aktivitas protease dan ekspresi *Interleukin-1* (IL-1) pada organ paru. Ekspresi IL-1 diamati dengan metode imunohistokimia dan dihitung menggunakan *software Immunoratio*, sedangkan aktivitas protease diamati secara kuantitatif menggunakan perhitungan menurut Walter (1984). Data yang diperoleh dari hasil perlakuan dianalisa dengan menggunakan *Microsoft Office Excel* dan SPSS untuk *Windows* dengan analisis ragam ANOVA dan apabila ada perbedaan dilakukan uji lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha = 5\%$.

