

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama April 2016 - Agustus 2016 di Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang. Pengukuran aktivitas Enzim protease di Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya Malang dan pembuatan preparat histopatologi duodenum dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah bak plastik sebagai tempat pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat gelas (cawan petri, gelas ukur, labu takar (10, 100, 500, dan 1000 mL), tabung reaksi, pipet tetes, pengaduk kaca, tabung mikro, *plate* pembentuk gel, tabung polipropilen, *vortex* (Guo-Huq), seperangkat alat sentrifugasi, tabung sentrifus, *autoclave*, sonikator, spektrofotometri UV, mortar, penangas air, *refrigerator*, *freezer*, pH meter digital, neraca analitik, mikropipet, *disposable syringe*, alat elektroforesis, tabung reaksi, *timer*, corong, inkubator, talenan, seperangkat alat bedah, sonde lambung, spatula, wadah tertutup, dan saringan berbahan plastik.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rhodamin B, perasan bawang putih (*Allium sativum*), tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* umur 8-10 minggu dan berat badan rata – rata 180 gram, , reagen kit BMR (*Borax Main Reagent*), PBS, PBS-*Tween*, PMSF, tirosin, kasein, buffer fosfat,

akrilamida, *tri-chloroacetic acid* (TCA), etanol absolut 98%, Tris-HCl, NaCl fisiologis 0,9%, SDS 10%, gliserol, merkaptoetanol, bromofenol, glisin, TEMED, *Coomassie blue* R250, methanol, asam trikarboksilat, ammonium persulfat, asam asetat, protein standar (protein Ladder) dan sampel protein dari duodenum, es, dan akuades steril.

4.3 Variabel Penelitian

Adapun variabel dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Rhodamin B dan perasan bawang putih

Variabel tergantung : Aktivitas protease dan histopatologi jaringan duodenum

Variabel kontrol : Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar, berat badan \pm 200 gram, umur 8-12 minggu, jenis kelamin jantan, pakan BR 1, kondisi eksperimental seperti kandang disekat menjadi empat bagian yang diisi masing-masing 1 ekor tikus.

4.4 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Penentuan dosis rhodamin B dan volume pemberian perasan bawang putih
3. Pemaparan rhodamin B pada kelompok B, C, D, E serta pemberian perasan bawang putih pada kelompok C, D, E
4. Pengambilan jaringan duodenum
5. Pengujian aktivitas protease menggunakan metode spektrofotometri
6. Analisis hasil pengujian aktivitas protease dan histopatologi duodenum

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Estimasi besar sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus berikut:

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = banyaknya perlakuan yang dicoba

n = banyaknya ulangan yang diperlukan

Sehingga estimasi besar sampel hewan coba yang diperlukan sebanyak 20 ekor tikus dengan jumlah tikus sebanyak 4 ekor sebagai ulangan pada masing-masing kelompok perlakuan.

Hewan coba diaklimatisasi dengan kondisi laboratorium selama 7 hari. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok tikus, dengan uraian sebagai berikut : kelompok pertama sebagai kontrol negatif, yaitu diberikan pakan standar tanpa perlakuan (A), kelompok kedua sebagai kontrol positif yang diberi pakan mengandung rhodamin B tanpa pemberian perasan bawang putih (B), kelompok ketiga, keempat, dan kelima dipapar dengan rhodamin B melalui pakan dan diberikan perasan bawang putih berturut-turut sebanyak 0,5 ml/200gBB (C), 1 ml/200gBB (D), dan 1,5 ml/200gBB perasan Bawang putih (E) selama 14 hari. Tikus dikandangkan dalam bak plastik berukuran 17,5 X 23,75 X 17,5 cm dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan.

Tabel 4.1 Rancangan penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan			
	1	2	3	4
Histopatologi duodenum dan aktivitas protease				
Kelompok A (kontrol negatif)				
Kelompok B (kontrol positif)				
Kelompok C (pakan rhodamin B 600 ppm + 0,5 ml perasan bawang putih /200gBB)				
Kelompok D (pakan rhodamin B 600 ppm + 1 ml perasan bawang putih /200gBB)				
Kelompok E (pakan rhodamin B 600 ppm + 1,5 ml perasan bawang putih /200gBB)				

4.5.2 Pembuatan Perasan Bawang Putih (*Allium sativum*)

Perasan bawang putih dibuat dengan cara diblender sebanyak 1kg bawang putih yang sudah dikupas kulitnya dan bawang putih yang sudah diblender diletakkan di atas kertas saring. Setelah itu, diperas sampai tinggal ampas dari bawang putih saja, dari 1 kg bawang putih dapat dihasilkan kurang lebih 250 ml perasan bawang putih, kemudian air hasil perasan bawang putih yang sudah disaring siap untuk dikonsumsi atau diberikan kepada tikus sebagai perlakuan atau bila tidak langsung dikonsumsi dapat disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C untuk memperpanjang masa simpan dan agar tidak terjadi asidifikasi lanjut.

4.5.3 Penentuan Dosis Rhodamin B

Dosis rhodamin B yang digunakan didasarkan pada hasil temuan pada penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa paparan rhodamin B dengan

konsentrasi 600 ppm rhodamin B pada tikus dapat menimbulkan efek toksik pada organ dan saluran pencernaan tikus (Djarismawati, 2004). Menurut Mayori (2003), Pakan yang digunakan dalam pemeliharaan tikus putih adalah AD 2. Pakan diberikan sebanyak 10% berat badan, yaitu sekitar 10-15 g/ekor/hari. Jadi setiap kelompok perlakuan diberikan pakan sebanyak 10 g/ekor/hari.

Dalam penelitian ini kelompok A (kontrol negatif) dan kelompok B (kontrol positif rhodamin B) tidak diberikan air perasan bawang putih. Volume perasan bawang putih yang diberikan pada kelompok C, D, dan E yaitu sebanyak 0,5 ml/200gBB, 1 ml/200gBB, dan 1,5 ml/200gBB. Pemberian dosis perasan bawang putih yang diberikan pada kelompok C, D, dan E didasarkan dengan pertimbangan bahwa volume maksimal pemberian terapi air perasan bawang putih secara per oral pada tikus adalah sebesar 2 ml/200gBB (Priskila, 2008).

4.5.4 Pembuatan Sediaan Pakan yang Mengandung Rhodamin B dan Pemaparan Rhodamin B Pada Hewan Coba

Untuk setiap pembuatan 1 kg pakan yang mengandung Rhodamin B, dibutuhkan sebanyak 700 ml aquades sehingga rhodamin B dapat tercampur sempurna. Rhodamin B dengan konsentrasi 600 ppm dibuat dengan cara melarutkan 0,6 g serbuk rhodamin B kedalam 1 kg pakan. Setelah itu pakan dikeringkan dengan melalui proses pengeringan (oven) suhu 120°C selama 5 jam. Penambahan aquades dimaksudkan untuk mempermudah pakan dalam menyerap rhodamin B.

Pemberian paparan rhodamin B dilakukan dengan cara memberikan pakan yang mengandung rhodamin B dengan kadar 600 ppm sebanyak 10 gram per ekor pada kelompok tikus B, C, D, dan E selama 21 hari. Pada hari ke-22

dilakukan pembedahan pada hewan coba untuk pengamatan aktivitas protease dan struktur histopatologi duodenum.

4.5.5 Uji Konfirmasi Kandungan Rhodamin B dalam Pakan

Pakan yang telah dibuat selanjutnya diuji dengan menggunakan kit CMR (*Colours Main Reagent*) untuk mengkonfirmasi kandungan rhodamin B dalam pakan. Uji konfirmasi kandungan rhodamin B dalam pakan yang akan diberikan kepada seluruh kelompok tikus bertujuan untuk memastikan bahwa pakan yang akan diberikan sebagai perlakuan benar-benar mengandung rhodamin B. Uji konfirmasi ini dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 1 gram pakan yang akan diuji dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 3-5 tetes amonia dan tambahkan petroleum (bensin) 3-5ml, kemudian dikocok selama 3-5 menit, lalu dibiarkan sampai terjadi pemisahan larutan. Tuangkan larutan ekstrak bagian atas pada tabung reaksi lain. Tambahkan larutan ekstrak dengan larutan kit uji zat warna CMR (*Colour Main Reagent*) sebanyak 2-3ml. Selanjutnya ditunggu selama 1 menit dan diamati sampai timbul warna pada bagian bawah tabung reaksi (fraksi air), kemudian warna yang timbul dibandingkan dengan warna standar sehingga diketahui kandungan rhodamin B (Mahdi, 2013).

4.5.6 Pemberian Perasan Bawang Putih pada Hewan Coba

Pemberian air perasan bawang putih pada kelompok C, D, dan E selama 21 hari dilakukan melalui sonde lambung dengan frekuensi pemberian sebanyak 1 kali sehari. Selama 21 hari, kelompok tikus pertama hanya diberikan air minum dan pakan standar (A), kelompok kedua diberikan pakan yang mengandung rhodamin B dan tanpa pemberian perasan bawang putih (B), kelompok ketiga,

keempat, dan kelima diberikan perasaan air bawang putih selama 7 hari kemudian selanjutnya pakan yang telah dicampur dengan rhodamin B dan diberikan perasan bawang putih sebanyak 0,5 ml/100gBB/hari (C), 1 ml/100gBB/hari (D) dan 1,5 ml/100gBB/hari (E). Pada hari ke-22 tikus dibedah dan diamati aktivitas protease serta struktur histopatologi jaringan duodenum.

4.5.7 Pengambilan Jaringan Duodenum

Euthanasia hewan coba dilakukan melalui dislokasi leher. Tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal di atas papan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian abdominal untuk mengambil jaringan duodenum. Selanjutnya dilakukan isolasi organ duodenum kemudian disimpan pada larutan PBS untuk pengujian aktivitas protease.

4.5.8 Pengujian Aktivitas Protease

Pengujian terhadap aktivitas protease dilakukan sesuai dengan metode Walter dalam Pratiwi dkk. (2013) dan Saptono (2014) yang meliputi tahapan isolasi protein, pembuatan kurva baku tirosin, dan pengukuran aktivitas protease.

4.5.8.1 Isolasi Protein

Isolasi protease dimulai dengan mengambil 0,5 gram sampel organ duodenum yang dipotong kecil-kecil dengan menggunakan gunting bedah. Selanjutnya ditambahkan dengan larutan PBS-Tween : PMSF (9:1) sebanyak 1 ml dan pasir kuarsa untuk memecah jaringan dan sel, lalu digerus dengan mortar yang diletakkan diatas balok es untuk mengkondisikan tetap dingin. Setelah itu ditambahkan larutan PBS-Tween : PMSF (9:1) sebanyak 2 ml ke dalam homogenat dan dipindahkan ke dalam tabung polipropilen steril. Selanjutnya

dihomogenkan dengan mesin vorteks selama 10 menit, disonikasi menggunakan sonikator selama 10 menit dan disentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm) untuk memisahkan protein dan jaringan. Selanjutnya supernatannya diambil dan ditambah dengan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan, lalu disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Selanjutnya dilakukan pengambilan endapan dan dikeringkan hingga bau etanol hilang. Pada endapan ditambah dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5 dingin dengan perbandingan 1:1 dan dilakukan homogenisasi.

4.5.8.2 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Disiapkan 10 labu ukur yang masing-masing diisi dengan larutan baku tirosin 20 ppm 1,2,3,4,5,6,7,8,9, dan 10 mL untuk konsentrasi 2,4,6,8,10,12,14,16,18, dan 20 ppm. Setelah itu diencerkan dengan akuades sampai tanda batas kemudian tabung ditutup dengan aluminium foil lalu dikocok. Selanjutnya diukur serapannya pada masing-masing konsentrasi larutan baku pada panjang gelombang maksimum. Blanko yang digunakan adalah akuades.

4.5.8.3 Pengukuran Aktivitas Protease

Pengukuran aktivitas protease dimulai dengan mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200 μ L dan larutan bufer fosfat pH 7 sebanyak 300 μ L dan 100 μ L ekstrak kasar protease lalu didiamkan 60 menit pada suhu 37^oC di dalam inkubator. Kemudian ditambahkan 400 μ L larutan TCA 4% dan didiamkan selama 30 menit pada suhu 27^oC (suhu kamar). Selanjutnya dilakukan sentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit. 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. Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai banyaknya satu mikromol tirosin per menit pada kondisi optimal enzim tersebut pada reaksi enzimatik.

Aktivitas protease dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

Keterangan :

v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi (menit)

fp = faktor pengenceran

p = jumlah enzim (mL)

Mr = Massa relatif tirosin 181 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$

4.5.9 Pembuatan preparat histopatologi duodenum

Tikus dimatikan pada hari ke-22 dengan cara dislokasi leher (cervicalis dislocation), dilanjutkan dengan pembedahan dan pengambilan organ duodenum. Selanjutnya dilakukan pencucian sampel duodenum dengan menggunakan NaCl fisiologis 0.9% untuk menghilangkan darah. Selanjutnya dilakukan pembuatan preparat histologi duodenum dengan tahapan fiksasi, dehidrasi dan infiltrasi, penjernihan (clearing), infiltrasi paraffin, embedding, sectioning, penempelan di gelas objek serta pewarnaan menggunakan HE. (Kiernan, 1990; Janqueira & Carneiro, 2007).

4.6 Analisa Data

Data pengamatan hasil histopatologi duodenum dianalisis secara kualitatif. Analisis kualitatif untuk histopatologi duodenum dilakukan dengan perubahan struktur histologi duodenum menggunakan mikroskop. Sedangkan data hasil pengukuran aktivitas protease dianalisis secara kuantitatif menggunakan pola analisis ragam *one-way* ANOVA dengan pola analisis uji data menggunakan tabel pengamatan dua arah lalu dilanjutkan dengan analisis sidik ragam (keragaman). Kemudian apabila signifikan dilanjutkan uji *Tukey* (Beda Nyata Jujur) dengan $\alpha = 0,05$. Keseluruhan proses analisis dilakukan dengan bantuan program SPSS 20 *for windows* (Gamst, *et.al.*, 2008).

