

**PENGARUH PAPARAN LPS (*Lipopolisakarida*) TERHADAP
AKTIVITAS MALTASE HASIL ISOLASI DARI JEJUNUM
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

oleh :

ASTI RAHMANITA
0410923004-92



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PAPARAN LPS (*Lipopolisakarida*) TERHADAP
AKTIVITAS MALTASE HASIL ISOLASI DARI JEJUNUM
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

oleh :

ASTI RAHMANITA
0410923004

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang ilmu kimia

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES
NIP. 131 759 594

Dra. Anna Roosdiana, M.App. Sc
NIP. 132 000 070

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 131 653 134

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Asti Rahmanita

NIM : 0410923004

Jurusan : Kimia

Penulisan tugas akhir berjudul :

Pengaruh Paparan LPS (*Lipopolisakarida*) Terhadap Aktivitas Maltase Hasil Isolasi dari Jejunum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari tugas akhir yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama- nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam tugas akhir ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata tugas akhir yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Januari 2009

Yang menyatakan,

(Asti Rahmanita)

NIM. 0410923004

PENGARUH PAPARAN LPS (*Lipopolisakarida*) TERHADAP AKTIVITAS MALTASE HASIL ISOLASI DARI JEJUNUM TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)

ABSTRAK

Maltase (EC 3.2.1.20) adalah salah satu enzim yang dapat ditemukan pada membran *brush border* terutama pada mukosa usus halus (jejunum). Maltase berfungsi menghidrolisa maltosa menjadi glukosa. Rendahnya aktivitas maltase disebabkan oleh infeksi usus (Gastroenteritis) yang memberikan gejala diare, salah satu penyebab rusaknya sel mukosa disebabkan oleh paparan LPS (*Lipopolisakarida*), karena LPS merupakan komponen penyusun membran terluar bakteri gram-negatif yang bersifat endotoksin. LPS dapat merusak sel-sel mukosa jejunum dengan menstimulasi pelepasan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) yang dapat menyebabkan peradangan. Penelitian ini dilakukan menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan beberapa tahapan, yaitu pemaparan LPS dengan dosis 2,5 mg/kg BB tikus, penentuan aktivitas maltase dengan metode Nelson-Somogyi, penentuan berat molekul maltase dalam ekstrak kasarnya, dan pewarnaan HE (*Hematoxylen-Eosin*) organ jejunum. Paparan LPS dapat merusak sel-sel mukosa jejunum tikus yang ditunjukkan dengan gambaran histologis jejunum dan hilangnya beberapa pita protein dalam ekstrak kasar maltase. Aktivitas rata-rata maltase pada ekstrak kasarnya hasil isolasi dari jejunum tikus yang terpapar LPS dan tanpa paparan LPS berturut-turut adalah sebesar $19,05 \pm 0,03$ Unit (U) dan $21,89 \pm 0,04$ Unit (U), dimana aktivitasnya mengalami penurunan sebesar 12,97%. Analisa stastistika menggunakan Uji T dengan $\alpha=0,01$ menunjukkan bahwa pemaparan LPS memberikan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas ekstrak kasar maltase.

Kata kunci : Lipopolisakarida, Jejunum, Aktivitas maltase Reactive Oxygen Spesies (ROS)

THE INFLUENCE OF LPS (*Lipopolysaccharide*) TO MALTASE ACTIVITY ISOLATED FROM *Rattus norvegicus* JEJUNUM

ABSTRACT

Maltase (EC 3.2.1.20) is one kind of enzymes which can be found on brush border membrane especially in jejuna mucosa cells. The function maltase is to hydrolyze maltose become glucose molecule. Lower activity of maltase is caused by Gastroenteritis which has diarrhoea symptom, and it's commonly caused by LPS induction. Because LPS is a component on the outer membrane of gram-negative bacteria, endotoxin, and it can stimulate the production of ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) to make inflammation. *Rattus norvegicus* were used as a model and it was treated some procedures, such as LPS induction with dose of 2.5 mg/kg weight, determination of maltase activity using Nelson-Somogyi method, and it's molecular weight, Hematoxylen-Eosin staining of jejunum. LPS induction can damage the jejunal mucosa cells which were showed by the histological pictures and the unpresent of some protein bands. Average of maltase activity isolated from *Rattus norvegicus* jejunal that has been induced by LPS and control were 19.05 ± 0.03 Unit (U) and 21.89 ± 0.04 Unit (U), The decreasing percentage of maltase activity was 12.97%. Statistic analysis using T-Test with $\alpha = 0.01$ showed that LPS induction will decrease the maltase crude activity significantly.

Keywords : Lipopolysaccharide, Jejunum, maltase activity, Reactive Oxygen Spesies (ROS)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kehadiran Allah SWT, karena dengan rahmatNya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **“Pengaruh Paparan LPS (*Lipopolisakarida*) Terhadap Aktivitas Maltase Hasil Isolasi dari Jejunum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Penulisan tugas akhir ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Oleh sebab itu, penulis memberikan penghargaan dan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada:

1. Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES dan Dra. Anna Roosdiana, M.App. Sc, selaku dosen pembimbing I dan II yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan, masukan serta dukungan dalam penyelesaian tugas akhir ini.
2. Ir. Chasan Bisri, MSi, selaku dosen penasehat akademik yang telah memberikan bimbingan, arahan, dukungan, serta nasehat selama masa studi penulis.
3. DR. Rurini Retnowati, MSi., Dra. Tutik Setianingsih, MSi., Ir. Bambang Ismuyanto, MS., Dr. Barlah Rumhayati MSi., selaku dosen penguji yang telah memberikan bimbingan, kritik dan saran kepada penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
4. Dr. Sasangka Prasetyawan, Ms, selaku Ketua Jurusan Kimia, serta segenap Staf Pengajar dan Karyawan Jurusan Kimia untuk semua perhatian yang telah diberikan pada penulis.
5. DR. dr. Reza Gunadi Ranuh, sp A., yang telah memberikan kesempatan dan kepercayaan pada penulis untuk ikut serta dalam penelitiannya.
6. Semua pihak yang telah membantu penyelesaian tugas akhir ini.

Tugas akhir ini tentunya masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi penyempurnaan tugas akhir ini. Akhirnya, penulis berharap agar tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, januari 2009

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR ISTILAH	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Lipopolisakarida (LPS).....	5
2.2 Jejunum.....	8
2.3 Enzim maltase (E.C.3.2.1.20)	10
2.4 Isolasi Maltase	12
2.5 Penentuan Aktivitas Maltase.....	13
2.6 Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	14
2.7 Hipotesis	15
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	16
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	16
3.2.1 Bahan Penelitian	16
3.2.2 Bahan Kimia	16
3.2.3 Alat Penelitian	17
3.3 Metode Penelitian	17
3.4 Prosedur Penelitian	18

3.4.1 Preparasi Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	18
3.4.2 Pemaparan Lipopolisakarida (LPS).....	18
3.4.3 Pengambilan Organ Jejunum.....	18
3.4.4 Isolasi Maltase	18
3.4.5 Pembuatan Kurva Baku Glukosa dengan Metode Nelson-Somogyi.....	19
3.4.5.1 Penentuan λ Maksimum	19
3.4.5.2 Pembuatan Kurva Baku Glukosa.....	19
3.4.6 Uji Aktivitas Maltase dengan Metode Nelson-Somogyi.....	20
3.4.7 Penentuan Profil Protein dengan Metode SDS-PAGE	21
3.4.7.1 Persiapan Gel.....	21
3.4.7.2 Injeksi Sampel dan Running.....	22
3.4.7.3 Perlakuan Setelah Running	22
3.4.7.4 Penentuan Berat Molekul	22
3.4.8 Embedding Jejunum.....	23
3.4.9 Pembuatan Preparat Jejunum	23
3.4.10 Pewarnaan Hematoxylen-Eosin.....	23
3.4.11 Analisis Data.....	24

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Pem
aparan Lipopolisakarida (LPS)	25
4.2 Penentuan Berat Molekul Enzim Maltase dengan metode SDS-PAGE.....	26
4.3 Penentuan Aktivitas Maltase dengan Nelson- Somogyi.....	30
4.4 pewarnaan <i>Hematoxylen-Eosin</i> (HE).....	32

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	36
5.2 Saran	36

DAFTAR PUSTAKA	37
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN.....	42
----------------------	-----------

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Skematik bakteri gram (-) E-coli dan struktur kimia lipopolisakarida penyusun membran terluar.....	5
Gambar 2.2 Struktur bakteri gram (-) LPS E-coli.....	6
Gambar 2.3 Struktur kimia lipid A LPS E-coli.....	7
Gambar 2.4 Sistem Pencernaan Tikus (<i>Rattus Norvegicus</i>).....	9
Gambar 2.5 Usus Halus Tikus (<i>Rattus Norvegicus</i>).....	10
Gambar 2.6 Pembentukan disakarida (maltosa) dari dua monosakarida	12
Gambar 4.1 Elektroforegram hasil SDS-PAGE.....	27
Gambar 4.2 Reaksi Hidrolisis Maltosa dengan Maltase Sebagai katalis Katalis.....	30
Gambar 4.3 Hasil Pewarnaan Jejunum HE (Hematoxylen Eosin).....	33
Gambar 4.4 Struktur kimia lipid A dari LPS <i>E.coli</i>	34
Gambar 4.5 Mekanisme Reaksi Pembentukan Kompleks LPS-LBP.....	35

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1	Berat Molekul (BM) Protein pada Setiap Ekstrak Kasar Maltase.....27
Tabel 4.2	Hasil Pengamatan pada Pita 81 kDa (Pita Maltase).....28
Tabel 4.3	Data Rataan Aktivitas Maltase Hasil Isolasi dari Jejunum <i>Rattus norvegicus</i>31
Tabel L.2.1	Komposisi Larutan Separating Gel 12 % (1 plate) 50
Tabel L.2.2	Komposisi Larutan Stacking Gel 3% (1 plate) 50
Tabel L.4.1	Absorbansi Larutan Glukosa 4 ppm pada Berbagai Panjang Gelombang 61
Tabel L.5.1	Absorbansi Glukosa untuk Berbagai Konsentrasi pada $\lambda = 745 \text{ nm}$ 62
Tabel L.6.1	Aktivitas Maltase (pH6,5, suhu 37°C, waktu inkubasi 15 menit)..... 63
Tabel L.7.1	Penentuan T_{hitung} pada Aktivitas Maltase 64
Tabel L.8.1	Harga Rf dan Berat Molekul (BM) protein standar.....66
Tabel L.9.1	Harga Berat Molekul (BM) beberapa Pita Protein pada setiap Ekstrak Kasar Maltase.....68

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1	Skema Kerja Penelitian 42
Lampiran 2	Preparasi Larutan 43
Lampiran 3	Diagram Alir Penelitian 52
Lampiran 4	Penentuan λ Maksimum Larutan Glukosa 61
Lampiran 5	Kurva Baku Larutan Glukosa dengan Metode Nelson-Somogyi 62
Lampiran 6	Aktivitas Maltase pada Crude Enzim 63
Lampiran 7	Data dan Uji Statistik Aktivitas Maltase pada Ekstrak Kasar Maltase 64
Lampiran 8	Pembuatan Kurva Berat Molekul (BM) Protein Standar 66
Lampiran 9	Penentuan Berat Molekul (BM) Maltase dalam Ekstrak Kasar Maltase 67
Lampiran 10	Sertifikat Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang 68

DAFTAR ISTILAH

Singkatan/Istilah	Keterangan
g	gram
μg	mikro gram
M	Molar
mM	mili Molar
L	Liter
mL	mili Liter
μL	mikro Liter
ppm	part per million
nm	nanometer
pH	power of Hydrogen
rpm	radian per minutes
Mr	Massa Molekul relatif
kDa	kilo Dalton (Satuan Internasional Massa Molekul Relatif Protein)
BM	Berat Molekul
R_f	Retardation factor
LPS	Lipopolisakarida
ROS	Reactive Oxygen Spesies
PBS	Phosphate Buffer Saline
PMSF	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
UGB	Upper Gel Buffer
LGB	Lower Gel Buffer
RSB	Reducing Sample Buffer
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
TEMED	N,N,N',N' -tetramethyl ethylene diamine
UV-Vis	Ultra Violet-Visible

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keracunan makanan oleh bakteri sering terjadi baik di negara maju maupun negara yang sedang berkembang walaupun sudah terjadi perbaikan kesehatan dan ekonomi masyarakat. Hal ini dikarenakan saluran pencernaan manusia merupakan sistem yang terbuka. Apabila mikroba patogen yang terdapat pada makanan ikut termakan maka pada kondisi yang sesuai mikroba patogen akan berkembang biak di dalam saluran pencernaan dan menyebabkan gejala penyakit atau sering disebut infeksi. Racun atau toksin yang dihasilkan oleh mikroba patogen yang ikut termakan menyebabkan gejala penyakit yang disebut keracunan atau intoksikasi. Gejala akut yang disebabkan oleh mikroba patogen adalah diare, muntah, dan pusing-pusing bahkan pada kondisi yang parah dapat menyebabkan kematian (Rahayu, 2006).

Menurut laporan WHO, diare membunuh dua juta anak di dunia setiap tahun, sedangkan di Indonesia, diare merupakan salah satu penyebab kematian kedua terbesar pada balita, sekitar 162 ribu balita meninggal setiap tahun atau sekitar 460 balita setiap harinya. Salah satu penyebab utama disentrinya adalah bakteri gram (-) *Escherichia coli* yang dinding selnya mengandung LPS (*Lipopolisakarida*) (Amiruddin, 2007).

Lipopolisakarida (LPS) atau lebih dikenal dengan nama endotoksin, adalah suatu senyawa kompleks yang terdapat pada dinding sel terluar dari bakteri gram negatif yang merupakan salah satu faktor penyebab terjadinya proses peradangan. Senyawa tersebut dapat menyebabkan berbagai penyakit, misalnya: *gastroenteritis*, demam, kolera, tetanus, tekanan darah rendah, berbagai macam infeksi dan lain sebagainya. Toksisitasnya ditentukan oleh lipid A. Struktur kimia lipid A dan berbagai spesies bakteri pada dasarnya adalah identik, berisi D-glukosamin yang berikatan dengan disakarida. Induksi LPS dapat menyebabkan kerusakan organ salah satunya membran *brush border* pada saluran pencernaan. Jika tidak segera ditangani akan menyebabkan kematian (Winarno, 1995).

Menurut Ranuh, *et. Al*, 2008 : LPS dengan dosis 2,5 mg/kg berat badan tikus dapat menyebabkan kerusakan membran *brush border* dari saluran pencernaan terutama pada sel mukosa jejunum. Serta dapat menurunkan aktivitas enzim-enzim disakaridase yang terdapat dalam saluran pencernaan tersebut.

Gastroenteritis adalah penyakit radang pada lambung dan usus yang memberikan gejala diare, dengan atau tanpa disertai muntah, dan sering kali disertai peningkatan suhu tubuh. Diare yang dimaksudkan adalah buang air besar berkali-kali (dengan jumlah yang melebihi 4 kali, dan bentuk feses yang cair, dapat disertai dengan darah atau lendir (Leane, 2006).

Salah satu hal yang menyebabkan kerusakan jaringan adalah infeksi oleh bakteri. Bakteri dapat menginduksi kerusakan secara tidak langsung dengan menstimulasi sel-sel radang untuk merusak jaringan pembawa dengan melepaskan enzim destruktif, spesies oksigen reaktif dan faktor pro-apoptotik (Alikhani *et. Al*, 2004). Dampak yang dapat terjadi karena infeksi saluran cerna antara lain: pengeluaran toksin yang dapat menimbulkan gangguan sekresi dan reabsorpsi cairan dan elektrolit dengan akibat dehidrasi, gangguan keseimbangan elektrolit dan gangguan keseimbangan asam basa. Invasi dan destruksi pada sel epitel, serta kerusakan mikrovili yang dapat menimbulkan keadaan maldigesti dan malabsorpsi. Kerusakan mukosa usus halus atau usus kecil dapat menyebabkan berkurangnya aktivitas maltase (Koetse *et.al*, 2006).

Maltase adalah salah satu enzim pencernaan yang terletak di dalam usus halus yaitu di bagian vili dan mukosa. Fungsinya menghidrolisa maltosa menjadi glukosa yang kemudian diserap ke dalam darah melalui dinding usus. Rendahnya aktivitas maltase disebabkan oleh infeksi radang usus (*Gastroenteritis*) yang memberikan gejala diare, dengan atau tanpa disertai muntah, dan sering kali disertai peningkatan suhu tubuh (Heyman, 2006). Menurut Zein (2004): Perlekatan bakteri gram (-) ke epitel usus dapat menyebabkan kerusakan membran mikro vili sehingga mengganggu aktifitas disakaridase. Oleh karena itu, paparan LPS secara langsung dapat mempengaruhi aktivitas enzim Maltase.

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka pada penelitian ini dikaji mengenai pengaruh paparan LPS terhadap aktivitas enzim Maltase hasil isolasi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) dan sejauh mana tingkat kerusakan organ jejunum yang ditimbulkannya.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka permasalahan yang akan dikaji dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah paparan LPS secara per oral berpengaruh terhadap aktivitas enzim Maltase hasil isolasi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*)?
2. Apakah ada perbedaan gambaran histologis organ jejunum antara tikus kontrol dan tikus yang terpapar LPS?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) jantan usia 2 bulan dengan berat badan 100 gram, yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Brawijaya. Penggunaan hewan coba ini telah sah dengan mendapat sertifikat layak etik dari Komisi Etik Universitas Brawijaya Malang.
2. Dosis pemaparan LPS E-coli yang diberikan pada hewan coba yaitu pemberian dosis 2,5 mg/kg berat badan tikus dan diberikan secara per oral.
3. Gambaran histologi jejunum dilakukan dengan metode pewarnaan *Hematoxylen-Eosin* dan diamati dibawah mikroskop.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini, adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh paparan LPS terhadap aktivitas enzim maltase hasil isolasi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba.
2. Untuk mengetahui perbedaan gambaran histologis organ jejunum hasil isolasi dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang kontrol maupun yang telah dipapar oleh LPS.

1.5 Manfaat penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah diharapkan dapat dipakai sebagai acuan perbaikan saluran cerna akibat paparan LPS berdasarkan aktivitas ekstrak kasar maltase hasil isolasi jejunum yang merupakan salah satu enzim pencernaan yang penting.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lipopolisakarida (LPS)

LPS adalah komponen utama dari dinding sel bakteri gram-negatif dan diketahui dapat memicu beberapa jenis reaksi peradangan atau infeksi (inflammatory) pada sel makrofag dan sel lainnya. Faktanya, LPS diketahui dapat menstimulasi makrofag dan sel endothelium yang berperan penting dalam pelepasan sitokin dan sel-sel radang lain selama proses infeksi. Produk dari tahapan infeksi ini dapat menyebabkan *shock* dan kerusakan organ (Stone, *et al*, 2003), (Liu *et al.*, 2002).

Lipopolisakarida (endotoksin) bakteri gram negatif diperoleh dari dinding sel *E.coli* dan sering kali dibebaskan ketika bakteri lisis. Bahan tersebut stabil terhadap panas. mempunyai berat molekul antara 3000 dan 5000 (Geo, *et al*, 2001). Menurut Heritage *et al.* (1996), LPS menyusun hingga 40% struktur permukaan dari bakteri gram-negatif, oleh karena itu keberadaannya sangat penting.

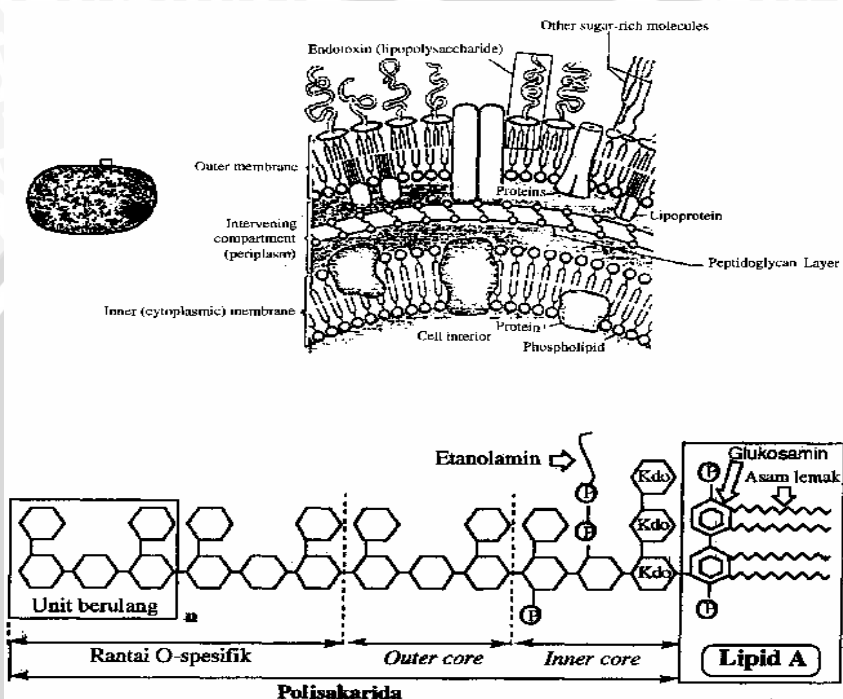
LPS terdiri dari 3 struktur, yaitu:

1. Polisakarida yang terdiri dari rantai O
2. Lapisan tengah (inti) yang terdiri dari lapisan luar dan dalam
3. Lapisan lipid A

Lapisan lipid A ini letaknya berdekatan dengan inti polisakarida (*core polysaccharide*) merupakan lapisan terpenting yang berperan dalam toksisitas endotoksin. Pada bakteri gram negatif mempunyai kemiripan pada struktur lapisan tengah dan lipid A tetapi berbeda pada rantai spesifik O (Widodo, 2006).

Keragaman ukuran LPS, tidak hanya mengubah sifat fisik dari bakteri (seperti *smooth* [S], *semi-rough* [SR], atau *rough* [R]), tetapi juga dapat mengubah respon bioaktif terhadap bakteri tersebut (Dixon and Darveau, 2005).

Berikut merupakan gambar skematik bakteri gram negatif (*E.coli*) dan struktur kimia Lipopolisakarida sebagai penyusun membran terluar *E.coli* (winarno, H, 1995):

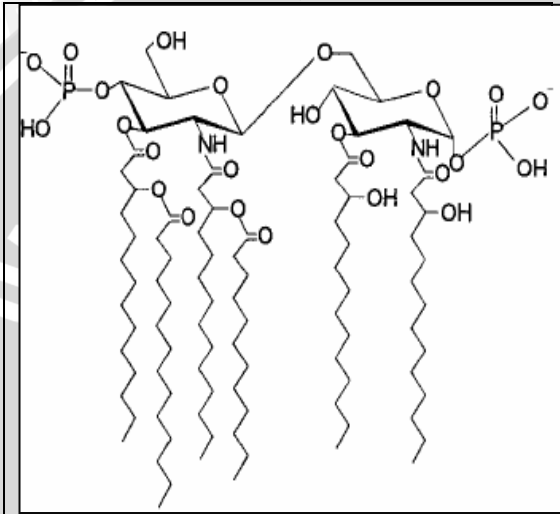


Gambar 2.1 Bakteri *E.coli* yang dinding selnya terbuat dari LPS

LPS di dalam host dapat berikatan dengan protein dan biasa disebut lipopolisakarida binding protein (LBP), yang berdampak pada penyebaran LPS. LBP merupakan katalis dalam pergerakan LPS menuju partikel *High Density Lipoprotein* (HDL), membran fosfolipid dan berikatan pada sisi aktif protein (Bo Yu, 1996). Pada binatang percobaan pemberian endotoksin menimbulkan reaksi berupa demam, syok, perubahan-perubahan sel leukosit, sitotoksik, perubahan reaksi hospes terhadap infeksi, perubahan-perubahan metabolisme dan sebagainya (Syahrurachman dkk, 1993).

LPS bersifat toksik terhadap hewan dan manusia, dan dikenal sebagai endotoksin. Toksisitasnya ditentukan oleh lipid A. Injeksi LPS dapat menyebabkan infeksi, yang pada akhirnya menimbulkan kerusakan organ hingga kematian (Heritage *et al.*, 1996).

Berikut ini struktur kimia dari lipid A yang berasal dari LPS *E.Coli* (Hashimoto, 2003):



Gambar 2.2 struktur kimia lipid A LPS E-coli

Menurut Dixon and Darveau (2005): Lipid A adalah suatu gula yang berkonfigurasi dengan heksoamin dan didasari oleh fosfolipid, yang bertindak sebagai bagian hidrofobik dari LPS. Lipid A pada *E. Coli* terdiri atas suatu 1,4'-bifosforilasi $\beta(1'-6)$ berikatan dengan kerangka dasar D-glukosamin disakarida (D-GlcN I, D-GlcN 2) yang merupakan heksa-asilasi melalui ester primer dan ikatan amida. Dengan disertai pula oleh substitusi kedua pada gugus hidroksil spesifik.

2.2 Jejunum

Usus halus merupakan bagian saluran pencernaan yang paling panjang, dibagi menjadi tiga bagian: duodenum, jejunum, dan ileum. Fungsi utama usus halus adalah pencernaan dan absorpsi hasil-hasil pencernaan. Fungsi usus halus terdiri atas transportasi, dan pencernaan makanan, serta absorpsi cairan, elektrolit, dan unsur makanan (Dharma, 1997).

Usus kecil bagian atas Usus halus atau usus kecil letaknya berdekatan dengan perut yaitu pada pylorus dan bagian utama dari usus halus adalah duodenum, dimana panjangnya sekitar 95 hingga 100 mm pada tikus. Jejunum dimulai pada bagian akhir dari duodenum, dan bagian ini merupakan bagian terpanjang dari usus. Rata-rata panjangnya berkisar antara 900 hingga 1350 mm pada tikus dan jejunum mengisi bagian sebelah kanan perut. Ileum merupakan bagian terakhir dari usus halus dan panjangnya antara 25 hingga 35 mm pada tikus (Walker, 2005).

Jejunum dan ileum pada manusia panjangnya sekitar 6 meter, dua perlima bagian atas merupakan jejunum. Letak jejunum mulai pada *junctura duodenojejunalis* dan ileum berakhir pada *junctura ileocaecalis*. Lekukan- lekukan jejunum melekat pada dinding posterior abdomen dengan perantara lipatan peritoneum yang berbentuk kipas yang dikenal sebagai mesenterium usus halus (Dharma, 1997).

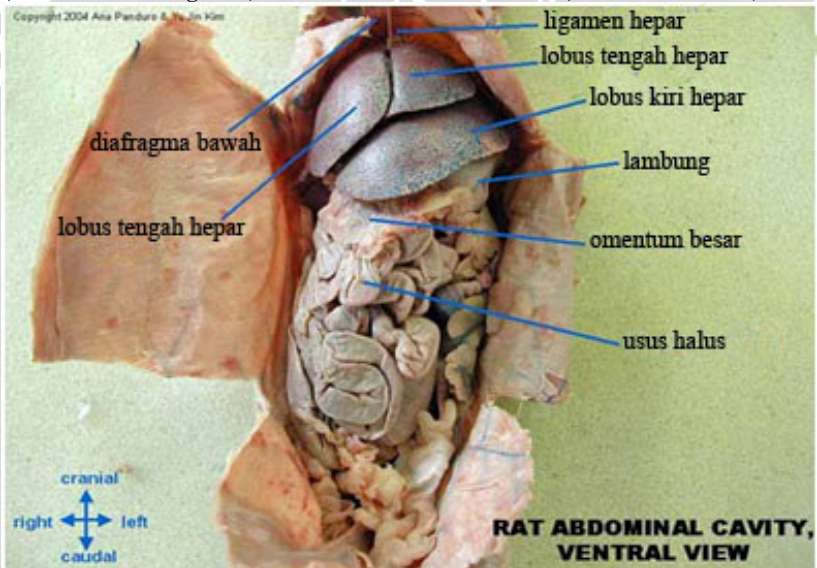
Getah pencernaan yang masuk ke dalam usus halus pada umumnya bersifat basa dengan pH sekitar 8. Kebiasaan ini menetralkan asam kimus dari saluran cerna yang masuk ke dalam usus dan relative masih bersifat asam didalam duodenum. Saat memasuki jejunum, secara bertahap dan perlahan mulai dinetralkan hingga saat berada di bagian akhir ileum pHnya menjadi agak basa (pH 7,5-8). Dalam hal ini terdapat sedikit perbedaan tergantung pada peneliti dan tehnik pengukuran. Jadi rentang pH isi usus halus adalah (Aiache, 1993):

- a. Duodenum : Bulbe 4-5
 Bagian menurun 5-6
- b. Jejunum : 6-7
- c. Ileum : 7-8

Kemampuan mencerna dari getah usus halus lebih lemah dibandingkan kemampuan enzim yang dihasilkan oleh mukosa. Kebanyakan enzim bersifat endoseluler dan dibawa ke dalam lumen lambung secara pengelupasan mukosa dan lisis sel. Enzim yang dihasilkan oleh mukosa tersebut antara lain (Hermida, 2006):

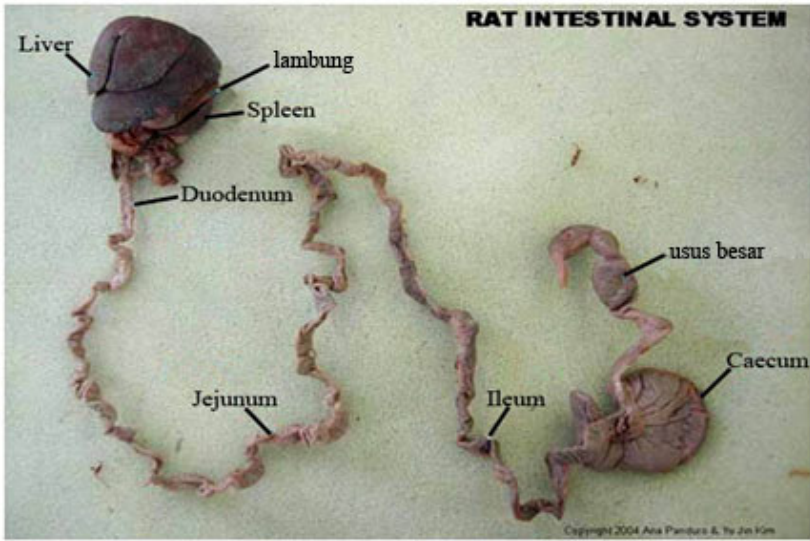
- a. Erepsine, gabungan peptidase yang menyempurnakan pemecahan protein;
- b. Nuklease dan nukleotidase yang memecah dislokasi asam nukleat beerinti purin dan pirimidin;
- c. Enzim yang menghidrolisis gula, invertase atau sakarose menghidrolisis sakarosa, maltase menghidrolisis maltosa, laktase menghidrolisis laktosa.

Berikut ini merupakan gambar dari sistem pencernaan tikus (*Rattus Norvegicus*) secara keseluruhan (Walker, 2005) :



Gambar 2.3 Sistem Pencernaan Tikus (*Rattus Norvegicus*)

Sedangkan di bawah ini merupakan gambar dari usus halus pada tikus (*Rattus Norvegicus*) (Walker, 2005) :



Gambar 2.4 Usus Halus Tikus (*Rattus Norvegicus*)

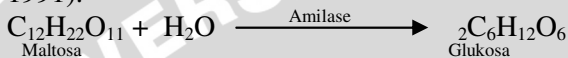
2.3 Enzim maltase (EC 3.2.1.20)

Enzim adalah biokatalisator sejati. Molekul ini akan meningkatkan dengan nyata kecepatan reaksi kimia spesifik dari pada tanpa enzim yang berlangsung sangat lambat. Walaupun dalam jumlah yang sangat sedikit, enzim berkemampuan mempercepat reaksi kimiawi 10^{12} - 10^{20} x (Muchtadi dkk,1992). Kecepatan reaksi enzimatik dipengaruhi oleh konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, suhu, pH serta adanya aktifator dan inhibitor (Poedjiadi, 1994):

Suhu rendah yang mendekati titik beku biasanya tidak merusak enzim. Pada suhu dimana enzim masih aktif, kenaikan suhu sebanyak 10°C , menyebabkan keaktifan menjadi 2 kali lebih besar ($Q_{10} = 2$). Pada suhu optimum reaksi berlangsung paling cepat. Bila suhu dinaikan terus, maka jumlah enzim yang aktif akan berkurang karena mengalami denaturasi. Enzim di dalam tubuh manusia memiliki suhu optimum sekitar 37°C (Indah,M, 2004).

Penentuan aktivitas enzim tersebut biasanya dilakukan pada pH maksimum, pada suhu yang mudah digunakan biasanya 25-38°C dan dengan konsentrasi substrat berlebih. Pengamatan reaksi dapat dilakukan dengan berbagai cara kimia seperti spektrofotometri (Wirahadikusumah, 2001).

Maltase-glucoamylase (EC 3.2.1.20) adalah salah satu enzim-enzim yang terletak di *brush border* usus halus yang berperanan sebagai langkah terakhir dalam suatu pencernaan yaitu menguraikan maltosa menjadi glukosa (Pereira, and Subramanyan, 1991):



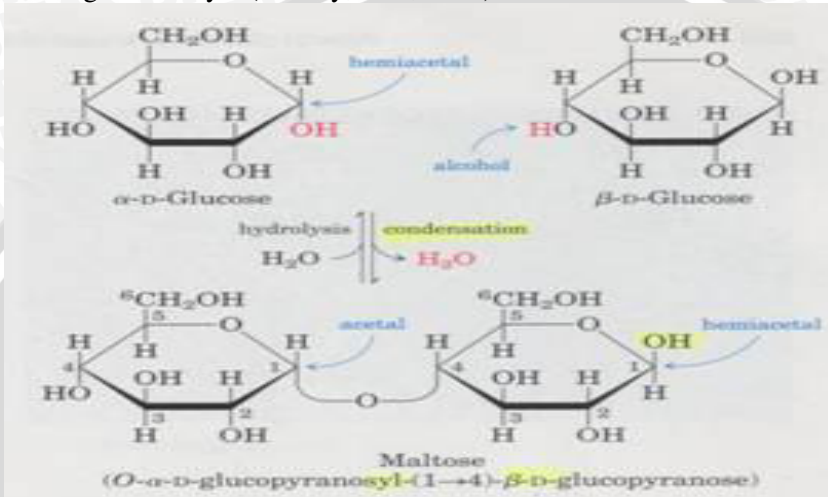
Bila enzim yang diperlukan jumlahnya berkurang, maka gula tidak dapat dicerna dan tidak dapat diserap. Karena itu, gula tetap berada dalam usus kecil. Kadar gula yang tinggi akan menarik cairan ke dalam usus halus dan menyebabkan diare. Gula yang tidak dapat diserap tersebut kemudian akan mengalami proses *fermentasi* oleh bakteri di usus besar, menghasilkan tinja yang bersifat asam dan menyebabkan *flatulensi*. Kekurangan enzim ini dapat terjadi pada penyakit *seliak*, sariawan tropikal dan infeksi usus (Fergus, 1995).

Maltosa terdapat pada membran *brush-border* terutama pada sel-sel villy dan mukosa usus halus fungsinya mencerna maltosa. Maltase pada membran *brush-border* memiliki berat molekul sebesar 81 kDa (Jacob *et. al*, 1999).

Maltose merupakan produk utama kerja α -amilase terhadap zat pati atau glikogen. Maltose tersusun dari dua sisa D-glukosa, satu D-glukosa dihubungkan lewat C₁ nya ke gugus hidroksil pada C4 pada D-glukosa yang lain. ikatan glukosidik dalam bentuk anomerik α -D-Maltose merupakan gula pereduksi, sebab satu D-glukosanya mempunyai gugus aldehid yang potensial (Montgomery, *et al*, 1993).

Enzim bertindak sebagai biokatalisator untuk suatu reaksi kimia yang spesifik. Sebagai contoh, gula maltosa dibuat dari dua molekul glukosa yang berikatan. Maltase dibentuk sedemikian sehingga dapat memecahkan ikatan dan membebaskan dua glukosa. Satu-satunya yang dapat melakukannya adalah maltase karena spesifik untuk masing-masing reaksi kimia yang diperlukan untuk membuat sel bekerja dengan baik. Berikut adalah gambar maltase yang berikatan dengan maltosa (Brain, 2001).

Maltosa mengandung dua unit D-glukosa dengan ikatan glikosida antara atom C-1 (karbon anomer) dari suatu glukosa dengan atom C-4 pada unit glukosa yang lainnya dengan konfigurasi ikatan glikosidanya (Murray, et al, 1993)



Gambar 2.5 Pembentukan disakarida (maltosa) dari dua monosakarida (Murray, et al, 1993)

Maltase, laktase, dan sukrase ditentukan dengan metode Dahlquist, menggunakan maltosa, laktosa, dan sukrosa sebagai substratnya. Aktivitas disakaridase pada umumnya diekspresikan sebagai mikromol dari disakarida yang terhidrolisis tiap menit tiap gram protein (Lee, et. al, 2003).

2.4 Isolasi Maltase

Isolasi atau pemurnian enzim adalah proses memisahkan protein tertentu dari ekstrak kasar seluruh sel yang mengandung banyak unsur lain (Robyt, 1981).

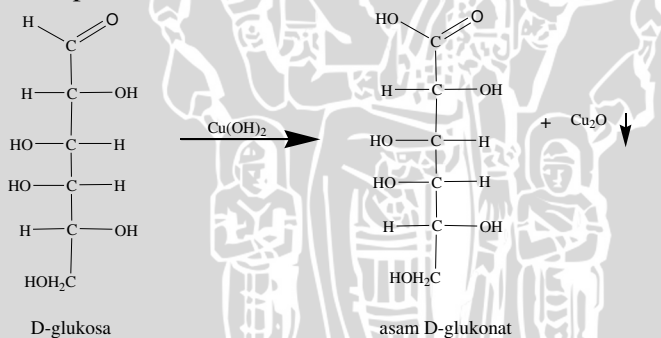
Menurut Robyt (1981), proses pengendapan enzim dilakukan dengan menambahkan pelarut organik, seperti aseton atau etanol. Enzim akan turun kelarutannya dalam air, sehingga enzim akan mengendap. Penambahan pelarut organik ini akan menurunkan kemampuan air untuk memisahkan muatan positif dan negatif pada

molekul protein sehingga terjadi agregat protein yang akhirnya mengendap. Pada saat pengendapan suhu harus dijaga sekitar 0°C dan pelarut organik harus didinginkan terlebih dahulu untuk mencegah terjadinya denaturasi protein. Untuk memisahkan endapan yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi dan dekantasi supernatannya. Selanjutnya endapan yang terbentuk dilarutkan dalam buffer yang sesuai.

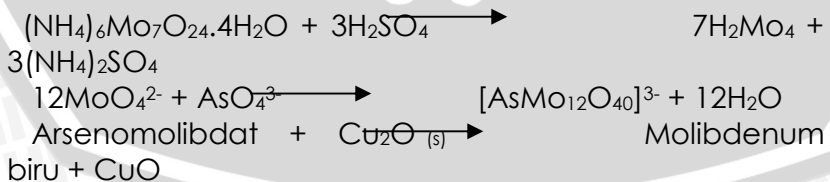
2.5 Penentuan Aktivitas Maltase dengan Metode Nelson-Somogyi

Aktivitas Maltase didapat dengan menentukan kadar D-glukosa yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis maltose. Penentuan kadar D-glukosa dilakukan dengan metode Nelson-Somogyi. Metode ini melibatkan dua tahap reaksi yaitu reaksi D-glukosa dengan pereaksi Nelson menghasilkan produk Cu_2O berupa endapan merah bata. Kemudian reaksi kedua adalah antara Cu_2O dengan pereaksi arsenomolibdat, dimana reaksinya adalah sebagai berikut:

1. Tahap 1 :



2. Tahap 2 :



Kuning Merah bata

Pembuatan pereaksi arsenomolibdat dilakukan dengan penambahan asam sulfat ke dalam amonium molibdat untuk menghasilkan asam molibdat (H_2MoO_4) yang larut pada kondisi asam berlebih. Arsenat dengan amonium molibdat (dari asam molibdat) bereaksi menghasilkan arsenomolibdat berwarna kuning yang dapat direduksi oleh tembaga (I) oksida menghasilkan kompleks *Molybdenum blue*, yang mempunyai panjang gelombang maksimum 740 nm dan intensitas ini tidak mengalami perubahan dalam 24 jam (Vogel,1994).

Untuk penentuan kadar D-glukosa digunakan persamaan Lambert-Beer $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ (mol/L) yang menyatakan hubungan antara besarnya serapan (A) terhadap konsentrasi D-glukosa, dimana jika dibuat grafik hubungan A dan C merupakan garis lurus dengan kemiringan $\epsilon \cdot b$ (Underwood,1993).

Keterangan :

- A : Absorbansi
- ϵ : Serapan spesifik
- b : Panjang lintasan menembus medium pengabsorpsi
- c : konsentrasi (g/L)

2.6 Hewan coba tikus putih (*Rattus Norvegicus*)

Mukosa pada lambung dan usus (gastrointestinal) dari tikus lebih mudah terkena efek induksi lipopolisakarida (LPS), Dimana induksi LPS ini dapat menyebabkan kerusakan usus (Adams and Barry, 2001).

Tikus yang digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian adalah *Rattus norvegicus* strain wistar yang memiliki klasifikasi sebagai berikut (Armitage, 2004):

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub filum	: Vertebrata
Klass	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Sub Ordo	: Sciurognathi
Familia	: Muridae

Sub Familia : Murinae
Genus : *Rattus*
Spesies : *Rattus norvegicus* strain Wistar

2.7

Hipotesis

Berdasarkan uraian diatas, hipotesis yang dapat diambil antara lain :

1. Paparan lipopolisakarida menurunkan aktivitas ekstrak kasar maltase hasil isolasi jejunum tikus (*Rattus Norvegicus*) sebagai hewan coba.
2. Paparan lipopolisakarida dapat mengakibatkan kerusakan histologis organ jejunum hasil isolasi dari tikus (*Rattus norvegicus*) .



BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Brawijaya Malang. Waktu penelitian yaitu pada bulan Februari hingga bulan juni 2008.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) jantan usia 2 bulan dengan berat 100 gram yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penggunaan hewan coba untuk penelitian ini telah sah dengan mendapat sertifikat layak etik dari Komisi Etik Universitas Brawijaya Malang.

3.2.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah LPS (*Escherichia coli* LPS serotype 0,55;B5,Sigma Chemical co.), Na_2HPO_4 , KCl, KH_2PO_4 , NaN_3 1%, Formaldehyde 37%, KMnO_4 , Na-tartrat . $4\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 anhidrat, NaHCO_3 , Na_2SO_4 anhidrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , ammonium molibdat, $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl (MD.Bio Inc.), glisin (MP Biomedicals Inc.), Tris base (*Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane*, MD.Bio Inc.), Tris-HCl ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ -HCl MD.Bio Inc.), glukosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ SERVA), D-maltosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$ SERVA), Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF, $\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$ Bio-Rad Lab.), etanol absolut 99% ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ Merck.), metanol absolut 99% (CH_3OH Merck.), asam asetat glasial (CH_3COOH Merck.), *acrylamide* ($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$ MP Biomedicals Inc.), *bis-acrylamide* ($\text{C}_2\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}_2$ Bio Basic Inc.), β -merkaptotanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_5$ MP Biomedicals Inc.), *sodium dodecyl sulphate* (SDS, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ MP Biomedicals Inc.), *ammonium persulphate* (APS,

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ Pharmacia Biotech); N,N,N',N' *tetramethyl ethylene diamine* (TEMED, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ Pharmacia Biotech), *bromophenol blue* ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ Merck), *commasive brilliant blue R-350* ($\text{C}_{45}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2\text{Na}$ SIGMA-Aldrich Co. Germany), Tween-20 (*Polyxyethylene Sorbitans Monolaurate*, Bio-Rad Lab.), xilol, parafin, hematoxylen, eosin, dan akuades steril.

3.2.3 Alat Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain: bak pemeliharaan hewan coba, ggavage, seperangkat alat bedah, seperangkat alat destilasi, seperangkat alat gelas (labu takar 10 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL, pipet tetes, mikro pipet, gelas ukur 100 mL, beaker glass 50 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, gelas arloji, corong gelas, tabung reaksi, pengaduk kaca, penangas air, mortar, mikropipet, rak tabung reaksi, waterbath, botol semprot, stirer, appendof, tabung polipropilene, lemari pendingin, digital pH meter (Inolab-WTW), neraca analitik (Sartorius basic P-160 kepekaan 0,0001 g – 160 g), tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi (Denley tipe BR 401), incubator (memmert), vortex (Guo-Huq), sonikasi (Branson 200), spektrofotometer UV-Vis, mikroskop cahaya (Nicon), hot plate, dan mini 2D elektroforesis protean II (Biorad).

3.3 Metode Penelitian

Metode yang dipergunakan pada penelitian ini melibatkan beberapa tahapan kerja yang meliputi :

1. Preparasi hewan coba
2. Pemaparan LPS pada hewan coba
3. Pengambilan organ jejunum
4. Isolasi enzim Maltase
5. Pembuatan kurva baku glukosa metode Nelson-Somogyi
6. Uji aktivitas enzim Maltase
7. Penentuan profil protein hasil isolasi dari organ jejunum dengan tehnik SDS-PAGE
8. Pembuatan preparat jejunum
9. Pewarnaan Hematoxylen-Eosin

3.4 **Prosedur Penelitian**

3.4.1 **Preparasi Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus Norvegicus strain Wistar*)**

Hewan coba di adaptasikan terlebih dahulu dengan lingkungan kandang di laboratorium selama 2 minggu, Tikus dibagi menjadi dua kelompok yaitu: (1) Kelompok yang tidak mendapat perlakuan apapun (kontrol), (2) Kelompok tikus yang diberi paparan lipopolisakarida (LPS).

3.4.2 **Pemaparan lipopolisakarida (LPS)**

Pemaparan LPS 1 mg/mL (*Escherichia coli* LPS serotype 0,55;B5,Sigma Chemical co.) dengan menggunakan *gavage*, dilakukan pada hewan coba tikus putih kelompok 2. Setiap hewan coba tikus kelompok 2 mendapatkan paparan LPS sebanyak 250 μ L dan dilakukan secara per oral. Pemaparan LPS hanya dilakukan sekali pada hari pertama setelah hewan coba beradaptasi dengan lingkungan kandang selama 2 minggu. Kemudian hewan coba dibiarkan 5 hari sebelum dilakukan pembedahan pada hari ke 6.

3.4.3 **Pengambilan organ jejunum**

Pengambilan organ jejunum dilakukan pada hari ke 6 setelah 5 hari pemaparan LPS. Sebelum dilakukan pengambilan organ jejunum, terlebih dahulu hewan coba didislokasi pada bagian leher untuk kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian perut, dimana tikus diletakkan dengan posisi terlentang bagian perut diatas pada papan pembedahan. Kemudian diambil bagian ususnya, 25 cm jejunum (dimulai dari distal hingga ligament Trietz) diisolasi dan dipotong. Jejunum mula-mula cuci dengan NaCl-fis 0.9% dingin. Kemudian jejunum dibagi menjadi dua bagian, yaitu $\frac{1}{4}$ bagian dimasukkan dalam larutan PFA 10 % dan $\frac{3}{4}$ bagian dimasukkan dalam larutan PBS-azida pH 7.4.

3.4.4 **Isolasi enzim Maltase**

Isolasi enzim maltase dilakukan pada bagian organ jejunum. Tahapannya adalah mula-mula organ jejunum dipotong kecil-kecil dengan menggunakan gunting, ditambahkan larutan PBS-Tween : PMSF (9 : 1) sebanyak 1 mL, ditambahkan sedikit pasir kuarsa, dan digerus dengan mortar dingin yang diletakkan diatas balok es.

Selanjutnya, homogenat ditambahkan dengan larutan PBS-Tween : PMSF (9 : 1) sebanyak 2 mL dan dipindahkan ke dalam tabung polipropilene steril. Homogenat divorteks selama 10 menit, disonikasi selama 10 menit, dan disentrifus selama 15 menit (6.000 rpm). Supernatnya diambil, kemudian ditambahkan etanol absolut dingin dengan perbandingan volume 1 : 1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Berikutnya, disentrifus selama 15 menit (10.000 rpm), diambil endapannya, dan dikeringkan hingga bau etanol hilang. Endapan ditambah dengan larutan 0.02 M Tris-Cl pH 6.8 dingin dengan perbandingan volume 1 : 1 dan dilakukan homogenisasi.

3.4.5 Pembuatan Kurva Baku Glukosa Metode Nelson-Somogyi

3.4.5.1 Penentuan λ Maksimum Larutan Glukosa

Penentuan λ maksimum larutan glukosa dilakukan dengan langkah pertama disiapkan larutan glukosa standar dengan konsentrasi 40 ppm, diambil sebanyak 1 mL, dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1 mL air bebas reduktor ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan pula 1 mL reagen Nelson ke dalam tabung reaksi. Lalu ditutup mulut tabung reaksi dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 20 menit. Selanjutnya, didinginkan tabung reaksi hingga mencapai suhu ruang dan ditambahkan reagen Somogyi (arsenomolibdat) sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi. Lalu divorteks hingga endapan yang terbentuk larut, didiamkan selama 2 menit, dan diencerkan larutan pada tabung reaksi dengan air bebas reduktor dalam labu ukur 10 mL. Berikutnya, diukur absorbansi larutan glukosa standar tersebut pada range λ 500-800 nm, dimana larutan blanko yang digunakan diperlakukan sama dengan sampel tetapi 1 mL larutan glukosa digantikan dengan 1 mL air bebas reduktor.

3.4.5.2 Pembuatan Kurva Baku Glukosa

Pembuatan kurva standar glukosa yang harus dilakukan adalah mula-mula disiapkan larutan glukosa standar dengan konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm. Selanjutnya, diambil masing-masing larutan standar glukosa sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam 6 buah tabung reaksi yang berbeda. Lalu, ditambahkan 1 mL air bebas reduktor ke dalam

masing-masing tabung reaksi dan ditambahkan pula 1 mL reagen Nelson ke dalam setiap tabung reaksi. Selanjutnya, ditutup mulut tabung reaksi dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 20 menit. Kemudian didinginkan tabung reaksi hingga mencapai suhu ruang dan ditambahkan reagen Somogyi (arsenomolibdat) sebanyak 1 mL ke dalam masing-masing tabung reaksi. Lalu dihomogenkan dengan vorteks hingga endapan yang terbentuk larut dan didiamkan selama 2 menit, dan diencerkan larutan pada masing-masing tabung reaksi dengan air bebas reduktor dalam labu ukur 10 mL. Berikutnya, diukur absorbansi masing-masing konsentrasi larutan glukosa standar pada λ maksimumnya, yaitu 745 nm, dimana larutan blanko yang digunakan diperlakukan sama dengan sampel tetapi 1 mL larutan glukosa digantikan dengan 1 mL air bebas reduktor (Sudarmadji, dkk, 1997).

3.4.6 Uji Aktivitas Enzim Maltase

Uji aktivitas maltase dilakukan dengan langkah awal adalah diambil crude maltase hasil isolasi masing-masing sebanyak 4 μ L, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, diencerkan 10 kali dengan menambahkan larutan Tris-Cl pH 6,5 dan ditambahkan larutan maltosa 36 mM masing-masing sebanyak 100 μ L. Kemudian ditutup mulut tabung dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Lalu ditambahkan air bebas reduktor masing-masing sebanyak 1 mL, dan ditambahkan pula reagen Nelson sebanyak 1 mL pada setiap tabung. Ditutup mulut tabung dengan aluminium foil, dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit, lalu didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Setelah itu, ditambahkan reagen Somogyi (arsenomolibdat) sebanyak 1 mL pada setiap tabung, di homogenkan dengan vorteks hingga endapan larut dan didiamkan selama 2 menit. Berikutnya, diencerkan larutan pada masing-masing tabung reaksi tersebut dengan air bebas reduktor dalam labu ukur 10 mL. Kemudian diukur absorbansinya pada λ maksimumnya, yaitu 745nm.

Blanko yang digunakan untuk uji aktivitas maltase diperlakukan sama dengan sampel tetapi crude enzim dimatikan aktivitasnya dengan dipanaskan pada penangas air pada temperatur 100 °C selama 15 menit sebelum dicampur dengan substrat.

Aktivitas enzim maltase ditentukan dalam satuan Unit (U) yang menyatakan banyaknya μ mol glukosa yang dihasilkan oleh

reaksi hidrolisis maltosa 36 mM dengan enzim maltase pada suhu 37°C dan pH 6.5 untuk setiap menitnya. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversi nilai absorbansi yang diperoleh pada konsentrasi glukosa standar, kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{glukosa}]}{\text{BM glukosa}} \times \frac{v}{p \times q} \times f_p$$

Di mana :

v = volume total sampel (mL)

p = jumlah enzim (mL)

q = waktu inkubasi (menit)

f_p = faktor pengenceran (mL)

3.4.7 Penentuan Profil Protein Hasil Isolasi dari Jejenum dengan Tehnik SDS-PAGE

3.4.7.1 Persiapan Gel

Pada persiapan gel, langkah pertama yang harus dilakukan adalah disiapkan plat gel dengan cara merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat ± 1 mm. Gel terbagi dari dua jenis yaitu gel sebagai tempat sampel (stacking gel) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (separating gel).

Separating gel dibuat dari Lower Gel Buffer (LGB), T-Acryl, ammonium persulphate (APS), N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine (TEMED) yang dilarutkan menjadi satu dalam aquadest steril. Kemudian dituangkan larutan separating gel dalam plat dengan menggunakan pipet, dituangkan pula aquadest steril di atas gel, dan dibiarkan 10-30 menit hingga gel memadat. Setelah gel mulai terbentuk atau memadat, dibuang aquadest yang berada di atas gel tersebut. Stacking gel dibuat dari Upper Gel Buffer (UGB), T-Acryl, APS, TEMED dan dialrutkan menjadi satu dalam aquadest steril. Kemudian dituangkan larutan stacking gel di atas separating gel yang telah memadat terlebih dahulu dengan pipet, dipasang sisiran hingga gel memadat dan terbentuk sumuran. Berikutnya setelah gel memadat, sisir dilepas, plat dipasang pada alat elektroforesis, dan dituangkan larutan running buffer pada alat tersebut.

3.4.7.2 Injeksi Sampel dan Running

Crude enzim Maltase hasil isolasi masing-masing diambil 10 μL , ditambahkan 10 μL larutan Tris-Cl, dan ditambahkan pula 20 μL *Reducing Sample Buffer* (RSB), dan dipanaskan pada penangas air pada suhu 100°C selama 10 menit. Selanjutnya, didinginkan dan setelah dingin dimasukkan sampel dalam sumur-sumur gel dengan volume 30 μL setiap sumuran. Dimana salah satu sumuran gel diisi dengan protein standar yang telah diperlakukan sama seperti sampel sebagai marker. Berikutnya, dihubungkan anoda dengan reservoir bawah dan katoda dengan reservoir atas. Lalu dihubungkan *power supply* dengan sumber arus listrik dengan arus sebesar 28 mA 128 volt selama 2-3 jam. Dihentikan proses pemisahannya jika warna penanda biru ± 0.5 cm dari batas bawah plat gel.

3.4.7.3 Perlakuan Setelah Running

Perlakuan setelah running adalah direndam gel hasil running dalam larutan pewarna (staining) dengan dikocok menggunakan shaker selama 30 menit. Selanjutnya, direndam gel hasil running tersebut dalam larutan penghilang warna (destaining) dengan dikocok menggunakan shaker hingga pita pada gel tampak jelas.

3.4.7.4 Penentuan Berat Molekul

Penentuan berat molekul ini ditujukan untuk mengetahui protein-protein yang berada dalam *crude* enzim Maltase, dimana setelah diperoleh besarnya berat molekul masing-masing proteinnya kemudian dibandingkan dengan suatu standart yang telah ada sebelumnya. Sehingga dapat diketahui jenis-jenis protein dalam *crude* enzim tersebut. Berat molekul dapat diperoleh dengan mengukur mobilitas molekul protein dalam gel poliakrilamid berdasarkan kurva standart berat molekul dari protein standart. Berat molekul protein ditentukan dengan membandingkan mobilitasnya terhadap serangkaian standar protein yang berat molekulnya telah diketahui (Marker). Mobilitas (atau R_f) diukur dengan menggunakan rumus berikut (Sumitro, 1996):

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal}}$$

Nilai R_f yang terhitung ditempatkan sebagai sumbu X dan berat molekul ditempatkan sebagai sumbu Y, grafik yang didapatkan berupa grafik linier dengan persamaan garis $Y = -ax + b$. Dari persamaan ini mobilitas dan berat molekul dari protein yang akan dicari diplotkan pada persamaan tersebut sehingga diketahui berat molekulnya.

3.4.8 Embedding Jejunum

Langkah pertama embedding adalah organ jejunum direndam dalam larutan fiksatif. Kemudian direndam dalam etanol 70% selama 24 jam. Kemudian organ dipindahkan dalam etanol 80% selama 2 jam; etanol 90% selama 20 menit; etanol 95% selama 20 menit; dan etanol absolut selama 20 menit, dimana langkah ini dilakukan sebanyak 3 kali. Selanjutnya adalah memindahkan organ jejunum pada larutan xilol 1 dan 2 masing-masing selama 20 menit. Xilol 3 dilakukan pada suhu 60-63 °C selama 30 menit. Lalu, organ jejunum dicelupkan dalam parafin cair yang telah dituang ke dalam wadah. Setelah beberapa saat paraafin akan memadat dan pankreas berada dalam blok parafin.

3.4.9 Pembuatan Preparat Jejunum

Pembuatan preparat jejunum dilakukan dengan mula-mula memasukkan jejunum pada blok parafin hasil embedding sebelumnya pada penjepit mitokrom dan diatur sejajar dengan mata pisau mitokrom. Sebelum pemotongan, diatur terlebih dahulu ketebalan irisan diatas 10 μm untuk mempercepat pencapaian bidang potong jaringan. Lalu, jejunum dipotong dengan ukuran 5 μm , diambil irisan dengan kuas dan dimasukkan air pada suhu ruang. Berikutnya, dipindahkan hasil irisan dengan kuas ke dalam air hangat 38-40 °C dan diambil irisan yang terentang sempurna dengan objek gelas. Irisan yang terpilih dikeringkan, diletakkan di atas hot plate 38-40 °C hingga kering dan setelah itu preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40 °C selama 24 jam.

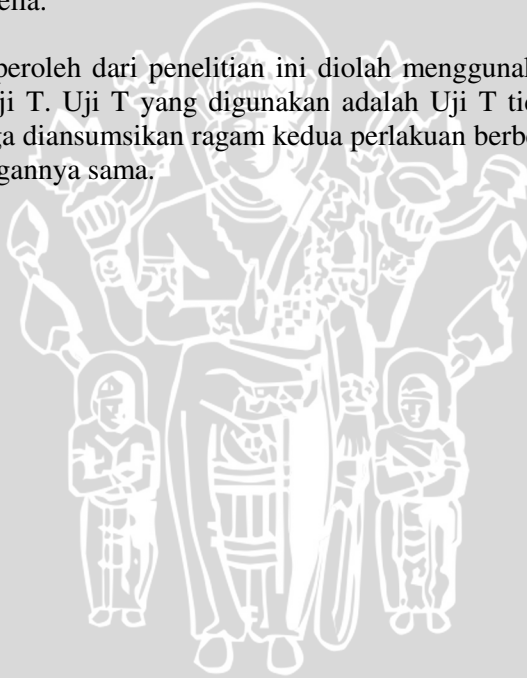
3.4.10 Pewarnaan Hematoxylen-Eosin

Pewarnaan hematoxylen-eosin mula-mula dilakukan dengan tahapan deparafinisasi, dimana preparat dimasukkan dalam xylol bertingkat 1-3 masing-masing selama 5 menit. Berikutnya, dilakukan tahapan rehidrasi preparat dimana preparat dimasukkan dalam etanol bertingkat yang dimulai dari etanol absolut 1-3, etanol 95, 90, 80,

dan 70 % masing-masing selama 5 menit. Lalu, direndam dalam aquadest selama 5 menit. Setelah itu dilakukan tahapan pewarnaan. Dimana dimasukkan preparat dalam jar pewarna hematoxylen hingga diperoleh hasil warna terbaik, 10 menit cukup untuk penetrasi warna dari preparat. Kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit, dibilas dengan aquadest, dan dimasukkan dalam pewarna eosin alkohol selama 5 menit. Lalu, direndam preparat dalam aquadest untuk menghilangkan kelebihan eosin. Berikutnya, dilakukan tahapan dehidrasi dengan preparat dimasukkan dalam seri alkohol bertingkat dari 80, 90, dan 95 % hingga alkohol absolut 1-3. Selanjutnya, dilakukan clearing yaitu dengan memasukkan preparat pada xylol 1, 2 dan dikeringanginkan. Setelah itu, dilakukan mounting dengan entella.

3.4.11 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini diolah menggunakan uji statistika yaitu Uji T. Uji T yang digunakan adalah Uji T tidak berpasangan, sehingga diansumsikan ragam kedua perlakuan berbeda dan jumlah pengulangannya sama.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Maltase merupakan enzim pencernaan yang penting fungsinya memecah maltosa menjadi glukosa yang kemudian diserap kedalam darah melalui dinding usus. Jika aktivitas maltase menurun maka gula tidak dapat dicerna dan tidak dapat diserap. Oleh karena itu, gula tetap berada dalam usus kecil. Kadar gula yang tinggi akan menarik cairan kedalam usus halus dan menyebabkan diare. Kekurangan enzim ini juga dapat menyebabkan infeksi usus (gastroenteritis).

Untuk mengetahui aktivitas dan sejauh mana tingkat kerusakannya diperoleh melalui beberapa tahap antara lain: Pemaparan LPS (*Lipopolisakarida*), penentuan berat molekul Maltase dengan tehnik SDS-PAGE, Penentuan aktivitas ekstrak kasar Maltase dengan metode *Nelson-Somogyi* pada kondisi optimum yaitu pH 6,5; suhu 37°C, waktu inkubasi 15 menit (Ranuh *et al.*, 2008), serta pewarnaan *Hematoxylen-Eosin* (HE) jejunum tikus yang terpapar LPS maupun tikus kontrol (tanpa perlakuan).

4.1 Pemaparan Lipopolisakarida (LPS)

Sebelum dilakukan pemaparan, tikus putih (*Rattus norvegicus*) diadaptasikan dengan lingkungan kandang terlebih dahulu dan diberi makan untuk mendapatkan berat yang ideal yaitu 100 gram. Setelah mencapai berat ideal, masing-masing tikus dipapar LPS, kecuali tikus kelompok satu yaitu tikus kontrol. LPS yang dipaparkan pada tikus merupakan LPS murni yang telah diisolasi dari bakteri gram (-) *Escherichia coli*. LPS (*Escherichia coli* LPS 2 mg/ 2 mL serotype 0,55;B5). Menurut Sommers, 2000: LPS dengan *serotype* 0,55;B5 menyebabkan infeksi usus dan diare lebih mudah.

Pemaparan LPS pada masing-masing tikus dilakukan per oral pada hari pertama dengan metode sonde menggunakan *Gavage* yang dimasukkan melalui mulut langsung menuju bagian lambung

(*Gastro*).Tujuannya untuk mempercepat penyampaian target yaitu merusak organ tikus. Pemaparan LPS per oral diberikan dengan dosis tunggal sebesar 2,5 mg/kg berat badan tikus, Jadi LPS yang dipaparkan sebanyak 250 μ L. Kemudian tikus diinkubasi 5 hari dan selanjutnya dilakukan pembedahan pada hari ke 6.

Hasil penelitian ini telah membuktikan bahwa dosis tunggal LPS mampu menyebabkan timbulnya kerusakan jaringan pencernaan tikus,khususnya pada organ jejunum. Menurut Heritage *et. al*, 1996: LPS bersifat toksik terhadap hewan dan manusia, serta dikenal juga sebagai endotoksin. Aktivitas patofisiologi LPS tergantung pada struktur kimia dari bagian hidrofobiknya, yaitu lipid A (Kato *et. al*, 1998).

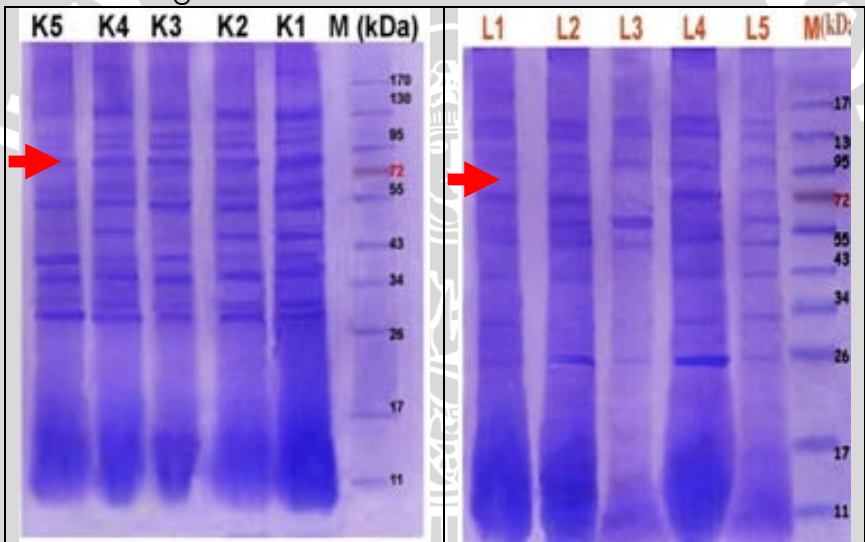
4.2 Penentuan Berat Molekul Enzim Maltase dengan metode SDS-PAGE

Berat molekul Maltase ditentukan dengan metode SDS-PAGE dengan tujuan untuk mengetahui efek LPS terhadap penurunan konsentrasi maltase hasil isolasi dari jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*).

SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) yaitu berdasarkan pada gerakan partikel yang bermuatan melalui suatu gel karena pengaruh medan listrik. Elektroforesis merupakan pemisahan molekul berdasarkan muatan dan berat molekulnya dalam medan listrik. Molekul pada penyusun enzim yang bermuatan positif akan bermigrasi ke elektroda negatif dan sebaliknya yang bermuatan negatif akan bermigrasi ke elektroda positif melalui suatu media penyangga yaitu gel poliakrilamid. Gel ini digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan Berat Molekulnya dengan menambahkan SDS untuk membantu pelarutannya dan melekatkan gugus ion dengan interval seragam di sepanjang rantai polipeptida sehingga pemisahannya hanya diakibatkan oleh ukuran berat molekul saja (Sudarmadji, 1996). Protein dengan berat molekul kecil akan melaju lebih cepat dibandingkan dengan protein yang mempunyai berat molekul lebih besar.

Berat molekul dari tiap-tiap pita proteinnya dilakukan dengan membandingkan pita yang dihasilkan dari tiap sumuran

dengan pita yang dihasilkan oleh marker atau standar. Pita-pita protein marker (M) ini telah diketahui harga berat molekulnya dan dapat dihitung harga Rf nya, sehingga dapat diperoleh persamaan regresi linier kurva standar yang menghubungkan Rf (sumbu X) dan log BM (sumbu Y). Untuk menentukan harga berat molekul dari Maltase dapat dilakukan dengan memplotkan harga Rf yang telah diperoleh ke dalam persamaan regresi linier kurva berat molekul protein standar. Sehingga dapat dibuktikan keberadaan enzim maltase pada ekstrak kasar maltase. Keberadaan pita protein Maltase hasil isolasi dari jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada hasil elektroforesis dengan berat molekulnya dapat dilihat pada Gambar elektroforegram 4.1.



Gambar 4.1 Elektroforegram hasil SDS-PAGE

Keterangan: K → tikus kontrol (tanpa paparan LPS)

L → Tikus LPS

M → Marker

(→) pita maltase 81 kDa

Tabel 4.1 Beberapa Berat Molekul (BM) Protein pada Setiap Ekstrak Kasar Maltase

Sumuran	BM protein (kDa)												
	26	28	29	30	36	40	46	69	81	95	116	129	170
Kontrol 1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
Kontrol 2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
Kontrol 3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
Kontrol 4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
Kontrol 5	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
LPS 1				V	V		V	V	V	V	V	V	V
LPS 2				V	V		V	V	V	V	V	V	
LPS 3							V	V	V	V	V	V	
LPS 4							V	V	V	V	V	V	
LPS 5							V	V	V	V	V	V	

Tabel 4.2 Hasil Pengamatan pada Pita 81 kDa (Pita Maltase)

Tikus	Sumuran	Ada	Jelas & Tebal
		Tidak	Tipis
Kontrol	1	Ada	Jelas & Tebal
	2	Ada	Jelas & Tebal
	3	Ada	Jelas & Tebal
	4	Ada	Jelas & Tebal
	5	Ada	Jelas & Tebal
LPS	1	Ada	Tipis
	2	Ada	Tipis
	3	Ada	Tipis
	4	Ada	Sangat Tipis
	5	Ada	Sangat Tipis

Keterangan: Khusus pada pita Maltase (81kDa):

- Tikus Kontrol (1,2,3,4,5) pita maltase terlihat jelas (tebal)
- Tikus LPS (1,2,3,4,5) pita Maltase terlihat tipis

Dari hasil elektroforegram membuktikan bahwa baik tikus kontrol (tanpa paparan LPS) maupun dengan paparan LPS sama-

sama menghasilkan maltase. Tikus tanpa pemaparan LPS (kontrol) maupun dengan pemaparan LPS mempunyai pita protein dengan berat molekul 81 kDa. maltase yang terdapat pada usus halus bagian jejunum setelah dimurnikan dengan tehnik SDS-PAGE mempunyai berat molekul 81 kDa. Tetapi berdasarkan Gambar elektroforegram SDS-PAGE ekstrak kasar maltase hasil isolasi dari jejunum tikus kontrol (tanpa paparan LPS) pita protein pada 81 kDa tampak lebih jelas dan tebal. Sedangkan pada jejunum tikus yang terpapar LPS pita protein pada 81kDa tampak tipis dan kurang jelas bahkan pita proteinnya ada yang hilang. Jadi jumlah maltase dengan pita 81kDa pada tikus terpapar LPS lebih sedikit dibanding dengan tikus kontrol. Hal ini terbukti bahwa tikus yang terkena LPS aktivitasnya menurun.

Pada tabel tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kasar Maltase hasil isolasi dari jejunum tikus yang tanpa kontrol (pemaparan LPS) maupun dengan pemaparan LPS mempunyai pita protein dengan berat molekul 81 kDa. Maltase yang terdapat pada usus halus setelah dimurnikan dengan tehnik SDS-PAGE mempunyai berat molekul 81 kDa. Hal ini membuktikan bahwa baik tikus tanpa paparan LPS (kontrol) maupun dengan pemaparan LPS sama-sama menghasilkan maltase. Tetapi berdasarkan Gambar elektroforegram SDS-PAGE ekstrak kasar maltase hasil isolasi dari jejunum tikus kontrol (tanpa paparan LPS) pita protein pada 81kDa tampak lebih jelas dan tebal. Sedangkan pada jejunum tikus yang terpapar LPS pita protein pada 81kDa tampak tipis dan kurang jelas. Jadi jumlah maltase dengan pita 81kDa pada tikus terpapar LPS lebih sedikit dibanding dengan tikus kontrol. Hal ini terbukti bahwa tikus yang terkena LPS aktivitasnya menurun.

Hasil ini sesuai dengan data aktivitas rata-rata ekstrak kasar maltase yang menurun, yaitu sebesar 19,05Unit pada tikus yang telah terpapar LPS. Dibandingkan dengan aktivitas rata-rata ekstrak kasar maltase pada tikus tanpa paparan LPS (kontrol), yaitu sebesar 21,89 Unit.

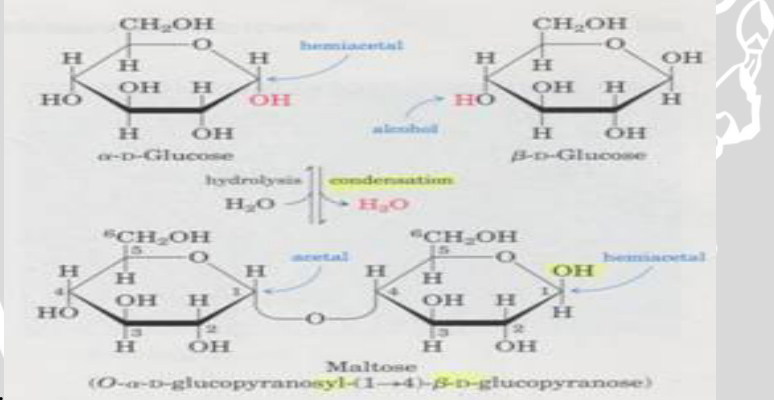
Pada Tabel 4.2 menunjukkan bahwa terdapat beberapa pita protein yang hilang pada ekstrak kasar maltase hasil isolasi dari jejunum tikus yang telah terpapar LPS, yaitu pita protein dengan berat molekul 26, 28, 29, 30,36,40, dan 170 kDa. Hal ini membuktikan bahwa LPS dengan dosis 2,5 mg/kg berat badan tikus

dapat menghilangkan sintesis beberapa protein sehingga dapat merusak jaringan jejunumnya.

4.3 Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Maltase hasil isolasi dari jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan Metode Nelson-Somogyi

Aktivitas ekstrak kasar maltase dinyatakan dalam satuan Unit (U), dimana satu unit aktivitas ekstrak kasar maltase menunjukkan banyaknya μmol D-glukosa yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis maltosa 56 mM oleh setiap milliliter (mL) maltase per menit pada kondisi optimumnya (pH 6,5, temperatur 37°C, waktu inkubasi 15menit) (Ranuh, *et. al.*, 2008).

Penentuan aktivitas ekstrak kasar Maltase dilakukan dengan reagen Nelson-Somogyi, yang diukur menggunakan spektrofotometri, dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh paparan lipopolisakarida (LPS) terhadap aktivitas enzim maltase, dimana aktivitasnya ditunjukkan oleh banyaknya glukosa yang terbentuk pada saat reaksi hidrolisis maltosa yang ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Reaksi hidrolisis Maltosa dengan Maltase sebagai katalis (Murray, et al, 1993)

Kadar D-glukosa yang terbentuk diketahui dengan mengukur absorbansi dari kompleks *Molybdenum Blue* pada panjang gelombang glukosa 745 nm. Absorbansi dari *Molybdenum Blue* sebanding dengan kadar gula pereduksi yang terbentuk. Karena kadar

gula yang terbentuk setelah reaksi hidrolisis maltosa berperan langsung pada proses pembentukan kompleks *Molybdenum Blue*. Kemudian harga absorbansi yang diperoleh diplotkan ke dalam persamaan regresi linier pada kurva baku glukosa.

Berdasarkan hasil penelitian, penentuan aktivitas ekstrak kasar maltase yang ditentukan dengan menggunakan rumus penentuan aktivitas enzim. Dari hasil penentuan aktivitas ekstrak kasar maltase dari 2 macam perlakuan tikus diperoleh data dan dapat membuktikan bahwa LPS sangat berpengaruh terhadap aktivitas ekstrak kasar maltase hasil isolasi dari jejunum tikus. Aktivitas maltase pada tikus yang terpapar LPS lebih rendah jika dibandingkan dengan aktivitas maltase pada tikus kontrol.

Tabel 4.3 Data rataan aktivitas maltase hasil isolasi dari jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*):

Sampel	UI	Aktivitas μmol/mL menit (U)	Aktivitas Rata-rata μmol/mL menit (U)	% Aktivitas	% Penurunan Aktivitas Rata-Rata
Kontrol	1	21,87	21,89 ±0,04	100	0
	2	21,88			
	3	21,93			
	4	21,88			
	5	21,88			
LPS	1	19,05	19,05 ±0,03	87,03	12,97
	2	19,06			
	3	19,08			
	4	19,02			
	5	19,03			

Dari hasil penelitian (Tabel 4.3) menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak kasar maltase hasil isolasi jejunum tikus yang telah terpapar LPS lebih rendah dibandingkan dengan tanpa pemaparan LPS. Dimana nilai aktivitas rata-rata ekstrak kasar maltase hasil isolasi dari jejunum tikus tanpa paparan LPS (kontrol) adalah $21,89 \pm 0,04$ Unit, sedangkan nilai aktivitas rata-rata ekstrak kasar maltase hasil isolasi dari jejunum tikus dengan paparan LPS adalah $19,05 \pm 0,03$ Unit. Aktivitas rata-rata ekstrak kasar maltase hasil isolasi dari jejunum tikus yang terpapar LPS mengalami penurunan

sebesar 12,97% dari aktivitas rata-rata ekstrak kasar maltase hasil isolasi dari jejunum tikus tanpa paparan LPS (kontrol).

Perbedaan aktivitas ekstrak kasar maltase juga dapat ditentukan melalui uji statistika, yaitu menggunakan uji T. Dimana dari uji T, diperoleh harga $t_{hitung} > t_{tabel} 1\%$ ($t_{hitung} = 178,62$; $t_{tabel} = 2,896$). Nilai uji statistika tersebut, menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak kasar maltase pada tikus yang tidak terpapar LPS (kontrol) berbeda nyata dengan aktivitas ekstrak kasar maltase pada tikus yang terpapar oleh LPS.

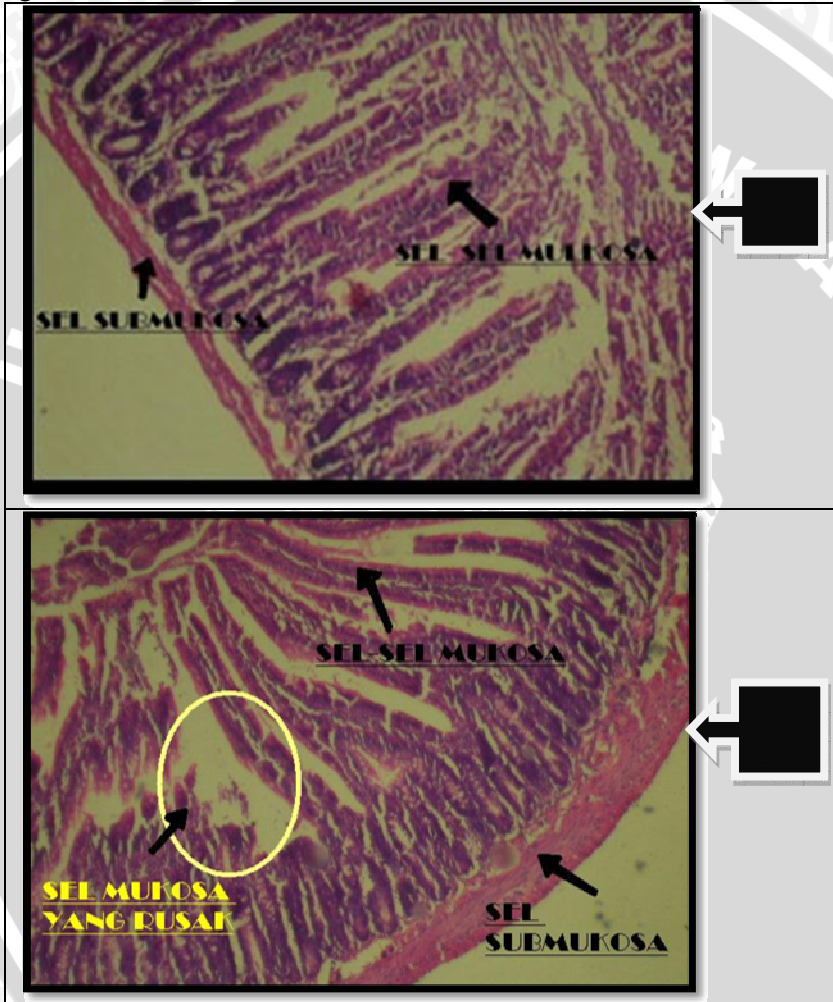
Penurunan aktivitas ekstrak kasar maltase ini disebabkan oleh rusaknya sel-sel mukosa pada jejunum oleh adanya paparan LPS. Maltase pada jejunum tikus dapat ditemukan pada bagian sel-sel mukosa. Maka akibat dari kerusakan sel-sel mukosa tersebut dapat menurunkan aktivitas maltase. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Ranuh (2008), mengungkapkan bahwa LPS dapat merusak membran *brush border* dari saluran pencernaan, terutama sel-sel mukosanya. LPS juga dapat menurunkan aktivitas enzim-enzim disakaridase yang terdapat dalam saluran pencernaan tersebut. Penurunan aktivitasnya juga dapat dilihat dengan menentukan Berat Molekul Enzim Maltase menggunakan metode SDS-PAGE.

4.4 Pewarnaan *Hematoxylen-Eosin* (HE) jejunum tikus yang terpapar LPS maupun tikus kontrol

Tingkat kerusakan organ jejunum dapat dilihat dengan metode pewarnaan Hematoxilen-Eosin (HE). Metode pewarnaan Hematoxilen-Eosin merupakan metode rangkap yang menggunakan 2 macam zat warna yaitu zat warna hematoxilen dan zat warna Eosin. Metode ini umumnya digunakan untuk mewarnai jaringan/organ yang membutuhkan kontras antara sitoplasma dengan inti. Hematoxylen sebagai zat warna yang bersifat basa, yang berupa garam dari basa-basa pembawa warna dengan radikal asam yang tidak berwarna, yang akan mewarnai bagian inti sel yang bersifat asam dengan warna ungu. Eosin merupakan zat warna yang bersifat asam yang dapat menimbulkan warna merah pada sitoplasma sel yang bersifat basa. Pada penelitian ini melalui pewarnaan HE

diperoleh suatu gambaran tingkat kerusakan jejunum yang dapat dibedakan antara yang kontrol dan perlakuan.

Hasil pewarnaan jejunum dengan HE (*Hematoxylen-Eosin*) tikus kontrol (tanpa perlakuan) maupun tikus LPS dapat dilihat pada gambar 4.3.



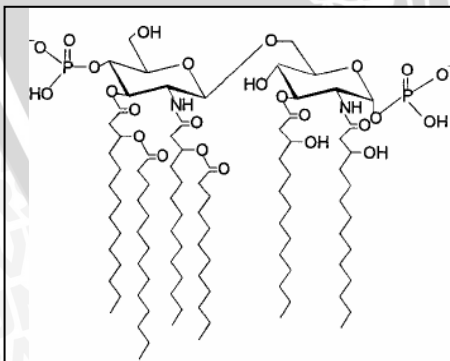
Gambar 4.3 Histologis jejunum tikus

A: Kontrol

B: Terpapar LPS

Berdasarkan kedua gambar tersebut (Gambar 4.2) terlihat perbedaan yang jelas antara histologis jejunum tikus kontrol (tanpa pemaparan LPS) dengan Histologis jejunum tikus yang terpapar LPS, yang ditunjukkan dengan banyaknya sel radang pada mukosa. Banyaknya sel radang akan menimbulkan produksi radikal bebas, yang dapat menghambat dalam metabolisme lipid. Pada tikus kontrol, sel-sel mukosanya terlihat kompak sempurna atau masih utuh. Sedangkan pada tikus yang terpapar LPS, sel-sel mukosanya terlihat rusak. Kerusakan sel-sel mukosa pada organ jejunum diakibatkan oleh LPS. Karena menurut Liu *et. al* (2002): LPS merupakan unsur glikolipid utama dari membran terluar pada bakteri gram-negatif yang berperan sebagai endotoksin. Toksisitasnya ditentukan oleh lipid A dapat menyebabkan shock infeksi dan kerusakan organ dengan menstimulasi makrofag untuk memproduksi serta melepaskan sel radang (Liu *et. al*, 2002). Sehingga hal ini menyebabkan efek patofisiologis seperti infeksi hingga merusak jaringan.

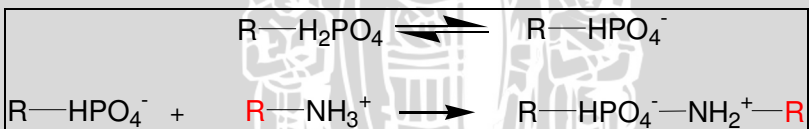
Menurut Dixon and Darveau (2005): Lipid A adalah suatu gula yang berkonfigurasi dengan heksoamin dan didasari oleh fosfolipid, yang bertindak sebagai bagian hidrofobik dari LPS. Lipid A pada *E. Coli* terdiri atas suatu 1,4'-bifosforilasi $\beta(1'-6)$ berikatan dengan kerangka dasar D-glukosamin disakarida (D-GlcN I, D-GlcN 2) yang merupakan heksa-asyilasi melalui ester primer dan ikatan amida. Dengan disertai pula oleh substitusi kedua pada gugus hidroksil spesifik. Struktur kimia dari lipid A yang berasal dari LPS *E. Coli* (Gambar 4.3) (Hashimoto, 2003):



Gambar 4.4 Struktur Kimia Lipid A dari LPS *E.Coli* (Hashimoto, 2003):

LPS dapat berikatan dengan beragam makromolekul diantaranya *LPS-binding protein* (LBP). LBP merupakan makromolekul yang disintesis oleh sel-sel epitel dari saluran pencernaan serta berada normal dalam serum, mempunyai ujung akhir NH_3^+ berperan aktif pada pengikatan lipid A dari LPS. Ketika LBP berikatan menjadi kompleks LBP-LPS akan menstimulasi makrofag untuk produksi dan pelepasan sitokin pro-inflamasi sehingga terjadi pelepasan sel-sel radang pada sel mukosa (Beumer *et. al*, 2003).

Proses pelekatan LPS dan LBP melibatkan komponen lipid A dari LPS yang mengandung gugus dihidrogen fosfat (H_2PO_4) dengan gugus ammonium positif (NH_3^+) yang berasal dari LBP. Dimana dihidrogen fosfat (H_2PO_4) ketika berada dalam jejunum yang memiliki pH 6-7 akan terhidrolisis dan kehilangan satu atom hidrogennya (H^+) menjadi hidrogen fosfat (HPO_4^-). Hilangnya satu atom hidrogen tersebut menyebabkan salah satu atom oksigennya bermuatan negatif (O^-). Sehingga atom O^- cenderung akan berikatan dengan gugus ammonium positif (NH_3^+) yang berasal dari ujung akhir LBP untuk menstabilkan strukturnya dan terbentuklah suatu kompleks baru, yaitu LPS-LBP. Kompleks LPS-LBP ini akan menstimulasi produksi dan pelepasan sel-sel radang oleh makrofag. Berikut ini mekanisme reaksi yang terjadi :



Gambar 4.5 Mekanisme Reaksi Pembentukan Kompleks LPS-LBP

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Paparan LPS dengan dosis 2,5 mg/kg berat badan tikus dapat menurunkan aktivitas maltase sebesar 12,98%. Aktivitas rata-rata ekstarak kasar maltase yang terpapar LPS adalah $19,05 \pm 0,03$ Unit (U). Sedangkan aktivitas rata-rata ekstarak kasar maltase yang tidak terpapar LPS (kontrol) adalah $21,89 \pm 0,04$ Unit (U).
2. Paparan LPS mempengaruhi gambaran histologis jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang ditunjukkan dengan adanya kerusakan sel-sel mukosa. Hal ini juga didukung oleh hilangnya beberapa pita protein ekstrak kasar hasil SDS-PAGE

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas dan BM spesifik maltase hasil isolasi dari jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*), baik yang terpapar LPS ataupun tanpa paparan LPS.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, J. K. and Barry L. T. 2001. **Coloni Production and Expression of IL-4, IL-6, and IL-10 in Neonatal Suckling Rats after LPS Challenge**. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280:G755-G762.
- Aiache, J.M., J. Ph. Devissaguet, M.M. Guyot-Hermann. 1993. **Farmasetika 2 : Biofarmasi**. Airlangga University Press. Surabaya.
- Alikhani, M., Z. Alikhani, D.T. Graves. 2004. **Apoptotic Effects of LPS on Fibroblasts are Indirectly Mediated through TNFR1**. J Dent Res 83(9):671-676.
- Amiruddin, R, 2007, **Current Issue Kematian Anak (Penyakit Diare)**, Fakultas Kesehatan Masyarakat jurusan Epidemiologi Universitas Hasanuddin Makasar.
- Armitage, David. 2004. **Rattus norvegicus**. Animal Diversity Web. University of Michigan of Zoology.
- Bo Yu. 1996. **Catalytic Properties of Lipopolysaccharide (LPS) Binding Protein From the Laboratory of Cellular Physiology and Immunology, The Rockefeller University, New York, New York 10021**
- Brooks, G. F., Janet S. B., Stephen A. M. 2001. **Mikrobiologi Kedokteran**. Penerbit Salemba Medika. Jakarta.
- Dharma, A. 1997. **Anatomi Klinik**. Departement of anatomy George washington University School of medicine and Health Sciences Washington, DC.
- Dixon, D.R. and Darveau R. P. 2005. **Lipopolysaccharide Heterogeneity: Innate Host Responses to Bacterial**

Modification of Lipid A Structure. J Dent Res
84(7):584-595.

Fergus M.C., 1995, **Food Nutrition and Health**, The A VI
Publishing Company inc, WeStport, Connecticut Stone, W.
L., Min Qui, Milton S. 2003.

Geo. F, Butel. J.S, Morse. A. S, 2001, **Mikrobiologi Kedokteran**,
Penerbit Salemba Medika, Jakarta.

Hashimoto, M. 2003. **LPS and Toll-like Receptor**.
<http://www.glycoforum.gr.jp>. diakses tanggal 12 Juli 2008.

Heritage, J., E.G.V. Evans, R. A. Killington. 1996. **Introduction
Microbiology**. Cambridge University Press. United
Kingdom.

Hermida, C., Guillermo C., Oscar H. Marti'nez-Costa, A.
Ferna'ndez-Mayoralas, Juan J. A. 2006. **Noninvasive
Evaluation of Intestinal Maltase with glucosidase and
Optimization of the Method in Rats**. Clinical Chemistry
52:2 270-277.

Heyman, M. B. 2006. **Maltose Intolerance in Infants, Children,
and Adolescents**. Pediatrics 118;1279-1286.

Indah, M. 2004. **ENZIM**. Fakultas kedokteran universitas Sumatra
Utara.

Jacob, Roberto Q, Bruce, R., Gary, D.199. **Contribution of Mucosal
Maltase-Glucoamylase Activities to Mouse Small
Intestinal Starcha-Glucogenesis1-3**, Institute of
Biochemistry and Molecular Medicine, University of Berne,
Berne CH-3012, Switzerland

Judoamidoyo, M., Darwis A. A dan Seid, E. G, 1992, **Teknologi
Fermentasi**, Rajawali press, Jakarta.

- Koetse, H. A., Roel J. V., Gieneke B. C. Gonera-De Jong, Marion G. P., Jean-M Ntoine, Frans S., Pieter J.J. S.. 2006. **Low Maltase Activity in a Small-Bowel Biopsy Specimen : Should Dietary Maltose Intake be Restricted in Children with Small Intestinal Mucosal Damage?**. Scandinavian Journal of Gastroenterology Vol. 41: 37-41.
- Kusumawati, D. 2004. **Bersahabat Dengan Hewan Coba**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Leane,S.M. 2006. **Gastroenteritis**. NSW Department of Health. Australia.
- Lee, Ping C., Mark S., and Hershel R. 2003. **Effects of Hypoxia on the Development of Intestinal Enzymes in Neonatal and Juvenile Rats**. Experimental Biology and Medicine 228:717-723.
- Lehninger, A.L. 1990. **Dasar- Dasar Biokimia Jilid1**. Erlangga. Jakarta.
- Lehninger, A.L. 1995. **Dasar-Dasar Biokimia Jilid I**. Alih Bahasa : Maggy Thenawidjaya. Erlangga. Jakarta.
- Liu, Shubing, David J. G., Angela M. G., Debra L. W., Xiaoyan Gong, Richard A. S., Andre A. G., Elisabeth L. H., Yoram V., Timothy R. B.. 2002. **Role of Toll-Like Receptors in Changes in Gene Expression and NF- β Activation in Mouse Hepatocytes Stimulated with Lipopolysaccharide**. Infection and Immunity Vol 70 No. 7 3433-3442.
- Montgomery, R., Robert, L. D., Thomas, W. C., Arthur, A. S.,1993, **Biokimia: Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus**, Gadjah mada University press, yogyakarta.
- Muchtadi, D., N.S. Palupi, M. Astawan. 1992. **Enzim dalam Industri Pangan**. Jendral Pendidikan Tinggi Pusat antar Universitas Pangan dan Gizi IPB. Bogor.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW ,1993, **Harper's Biochemistry Twenty-Third Edition**. Appleton & Lange, Norwalk Connecticut.

Norton S. Rosensweight, M.D, and Roberth H, 1997. **Dose Response of Jejunal Sucrase and Maltase Activities to Isocaloric High and Low Carbohydrate Diets in Man**. The American Journal of Clinical Nutrition. Amerika

Page, D.S., 1997. **Prinsip-Prinsip Biokimia**, Edisi kedua, Alih bahasa: Soendoro, R., Erlangga, Jakarta.

Pereira, B, and Subramanyan,S. 1991. **A comparison of the active site of maltaseglucoamylase from the brush border of rabbit small intestine and kidney by chemical modification studies**. Department of Life Sciences, University of Bombay, Vidyanagari, Santacruz (East), Bombay-400 098, India

Poedjiadi, A. 1994. **Dasar-Dasar Biokimia**. Penerbit UI. Jakarta.

Rahayu, K., 2006, **Isolasi dan pengujian Aktivitas Enzim**. PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta, hal 79-8

Ranuh, R., Subijanto MS., Ingrid S., Aulanni'am. 2008. **The Role of Probiotic *Lactobacillus plantarum* IS 20506 on Occludin and ZO-1 of Intestinal Tight Junctions Rehabilitation**. Makalah Seminar Nasional Basic Science dipublikasikan tanggal 26 Februari 2008 Malang.

Robynt dan White. 1981. **Biochemical Techniques Theory and Practise**. Brooks/Cole Publishing Company. California.

Stone, W. L., Min Qui, Milton S. 2003. **Lipopolisacaride Enhances The Cytotoxicity Of 2-Chloroethyl Ethylsulfide**. BMC Cell Biology 4:1.

Syahrurachman, A., Aidilfiet, C., Amin, S., dkk., 1994, **Buku Ajar, Mikrobiologi Kedokteran**, Edisi Revisi, FKUI, jakarta.

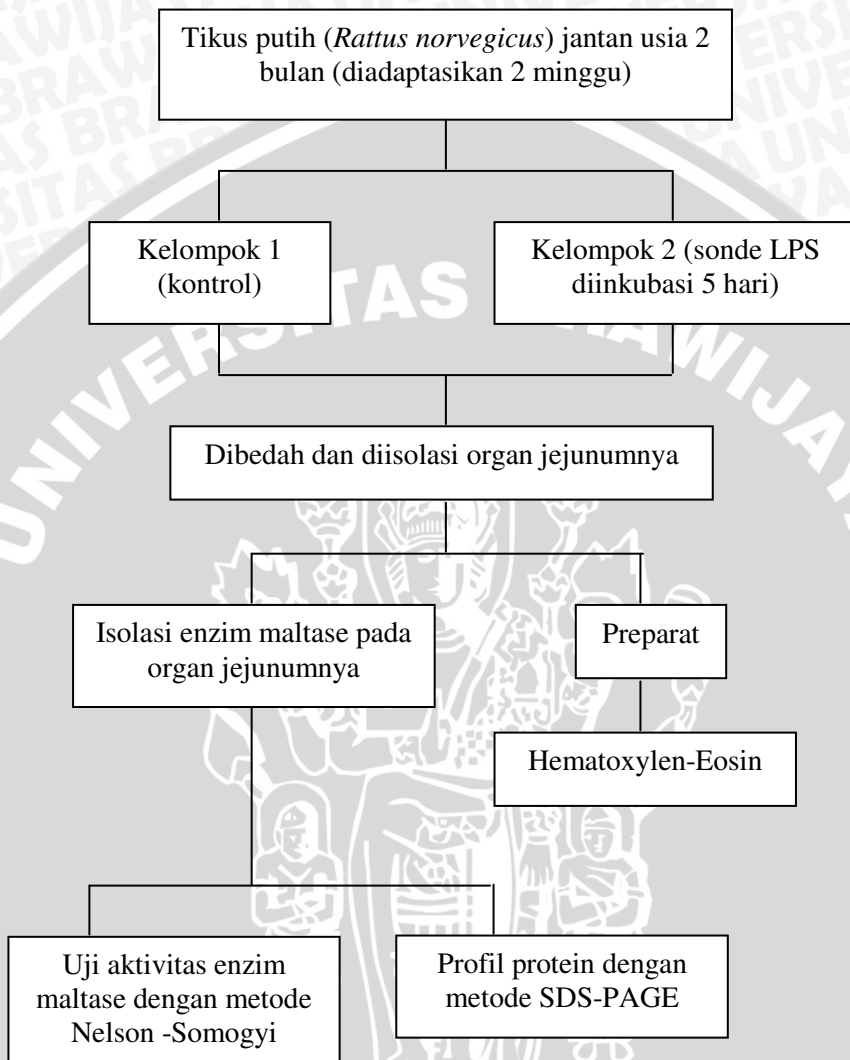
- Underwood, A.L, dan R.A. Day, Jr. 1993. **Analisa Kimia Kuantitatif**. Edisi Keempat. Cetakan Keempat. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Voet, D and Voet J.G. 1990. **Biochemistry**. John Wiley & Sons, New York.
- Vogel, A.I., 1994, **Text Book Of Macro And Semimicro Qualitative Inorganik Analysis**, 4th ed, Longmans, Green and Co Ltd, 214-242
- Waluyo, L. 2004. **Mikrobiologi Umum**. Penerbit Universitas muhamadiyah, Malang.
- Walker, W. A. and Maria L. F. 2005. **The Effect of Protective Nutrients on Mucosal Defense in the Immature Intestine**. Acta Paediatrica Vol 94 Issue 449 Pages 74-83
- West, E.S. 1996. **TEXTBOOK OF BIOCHEMISTRY**. 4th Ed., The Maxmillan Company. London.324-327, 334-336.
- Widodo, D. 2006. **Penanganan Sepsis**. Subbagian Penyakit Tropik Infeksi Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia / RSUPN dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. 2001. **Biokimia Protein, Enzim, dan Asam Nukleat**. Penerbit ITB. Bandung.
- Winarno, F.G, 1986, **Enzim Pangan**, P.T Gramedia, Jakarta.
- Winarno,H, 1995, **Lipid-A Pusat Aktif Endotoksin, Struktur Kimia Dan Bioaktivitasnya**, Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi - Batan, Jakarta.
- Zein, U. 2004, **Diare Akut Infeksius Pada Dewasa**, Fakultas Kedokteran Divisi Penyakit Tropik dan Infeksi Bagian Ilmu Penyakit Dalam, Unievrstias Sumatera Utara.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Skema Kerja Penelitian

UNIVERSITAS BRAWIJAYA





Lampiran 2. Preparasi Larutan

L.2.1 Penentuan Pengambilan LPS sesuai dosis

Besarnya dosis LPS yang dipaparkan adalah 2.5 mg/kg berat badan tikus. Dimana rata-rata berat badan tikus adalah 100 kg. Sehingga, banyaknya LPS yang digunakan adalah :

Dosis = 2.5 mg/kg berat badan

Maka,

$$\begin{aligned} \text{LPS yang digunakan} &= \frac{2.5 \text{ mg} \times 100 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \\ &= 0.25 \text{ mg} \end{aligned}$$

Konsentrasi LPS adalah 1 mg/mL. Dan μL LPS yang harus diambil adalah :

$$[\text{LPS}] = 1 \text{ mg/mL} = 1 \text{ mg} / 1000 \mu\text{L}$$

Untuk LPS sebesar 0.25 mg, maka μL LPS yang harus diambil adalah :

$$\begin{aligned} \mu\text{L LPS} &= \frac{0.25 \text{ mg} \times 1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mg}} \\ &= 250 \mu\text{L} \end{aligned}$$

L.2.2 Pembuatan Larutan Phosphate Buffer Saline (PBS) pH7,4

Tahapan pertama yang harus dilakukan adalah ditimbang KCl sebanyak 0.1 gram, KH_2PO_4 sebanyak 0.1 gram, NaCl sebanyak 4 gram, dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1.08 gram. Selanjutnya, dilarutkan bahan-bahan tersebut dalam 250 mL akuades steril dengan di kocok dan diatur pHnya hingga mencapai 7,4. Kemudian dipindahkan larutan ke dalam labu ukur 500 mL dan ditambah akuades sampai tanda batas.

L.2.3 Pembuatan Larutan PFA 10%

Pertama yang harus dilakukan adalah menyiapkan larutan stok PFA 37%. Sehingga untuk membuat larutan PFA 10% diperlukan volume larutan stok PFA 37% sebesar :

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$37\% \cdot V_1 = 10\% \cdot 250 \text{ mL}$$

$$V_1 = 67,56 \text{ mL}$$

Kemudian dipipet larutan stok PFA 10% sebanyak 67,56 mL dan dimasukkan dalam labu ukur 250 mL, dan di tambah NaCl-fis 0,9% sampai tanda batas.

L.2.4 Pembuatan Larutan NaCl-fis 0,9%

Tahapan yang mula-mula harus dilakukan adalah menimbang NaCl, dimana NaCl yang harus ditimbang adalah sebesar:

$$\begin{aligned}\text{NaCl-fis } 0,9\% &= \frac{0,9 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} \times 500 \text{ mL} \\ &= 4,5 \text{ gram}\end{aligned}$$

Kemudian, ditimbang NaCl sebanyak 4,5 gram dan dilarutkan dalam aquadest steril hingga volumenya mencapai 500 mL.

L.2.5 Pembuatan Larutan PBS-Tween

Pertama yang harus dilakukan yaitu diambil 200 mL larutan PBS pH 7,4 dalam gelas kimia 250 mL. Kemudian, ditambahkan 1 tetes larutan Tween dengan menggunakan pipet tetes. Lalu dihomogenkan larutan tersebut dengan magnetik stirer.

L.2.6 Pembuatan Larutan Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) 4 mM

Pertama yang harus dilakukan adalah menimbang PMSF yang diperlukan, yaitu sebesar :

$$\text{BM PMSF} = 174,2 \text{ g / mol}$$

Untuk membuat larutan PMSF 4 mM, maka :

$$\begin{aligned}a &= 174,2 \text{ g / mol} \times 0,004 \text{ mol / L} \\ &= 0,6968 \text{ g / L}\end{aligned}$$

Untuk 100 mL, PMSF yang harus ditimbang adalah :

$$\begin{aligned}\text{g Tris-HCl} &= 0,6968 \text{ g / L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,06967 \text{ g}\end{aligned}$$

Kemudian, ditimbang 0,06967 g dan dilarutkan terlebih dahulu dalam akuades steril sebanyak 80 mL. Lalu, dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambah akuades steril sampai tanda batas.

L.2.7 Pembuatan Larutan Buffer Tris-Cl pH 6,8

Mula-mula yang harus dilakukan adalah menimbang Tris-HCl yang diperlukan, yaitu sebesar :

$$\text{BM Tris-HCl} = 157,56 \text{ g / mol}$$

Untuk membuat buffer Tris-Cl 0,02 M, maka :

$$\begin{aligned} a &= 157,56 \text{ g / mol} \times 0,02 \text{ mol / L} \\ &= 3,1512 \text{ g / L} \end{aligned}$$

Untuk 200 mL, Tris-HCl yang harus ditimbang adalah :

$$\begin{aligned} \text{g Tris-HCl} &= 3,1512 \text{ g / L} \times 0,2 \text{ L} \\ &= 0,63024 \text{ g} \end{aligned}$$

Kemudian, ditimbang 0,63024 g dan dilarutkan dalam aquadest steril sebanyak 100 mL. Lalu, diatur pHnya hingga 6,8 dan ditambahkan kembali akuades steril hingga volumenya mencapai 200 mL.

L.2.8 Pembuatan Larutan Azida (NaN_3) 1%

Tahapan yang mula-mula harus dilakukan adalah menimbang NaN_3 , dimana NaN_3 yang harus ditimbang adalah sebesar :

$$\begin{aligned} \text{NaN}_3 \text{ 1\%} &= \frac{1 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} \times 10 \text{ mL} \\ &= 0,1 \text{ gram} \end{aligned}$$

Kemudian, ditimbang NaN_3 sebanyak 0,1 gram dan dilarutkan dalam akuades steril hingga volumenya mencapai 10 mL.

L.2.9 Pembuatan Larutan PBS-azida

Pertama yang harus dilakukan yaitu diambil 200 mL larutan PBS pH 7,4 dalam gelas kimia 250 mL. Kemudian, ditambahkan 8 tetes larutan azida 1% (NaN_3) dengan menggunakan pipet tetes. Lalu dihomogenkan larutan tersebut dengan magnetik stirer.

L.2.10 Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl pH 6,5

Mula-mula yang harus dilakukan adalah menimbang Tris-HCl yang diperlukan, yaitu sebesar :

$$\text{BM Tris-HCl} = 157,56 \text{ g / mol}$$

Untuk membuat buffer Tris-HCl 0,02 M, maka :

$$\begin{aligned} a &= 157,56 \text{ g / mol} \times 0,02 \text{ mol / L} \\ &= 3,1512 \text{ g / L} \end{aligned}$$

Untuk 200 mL, Tris-HCl yang harus ditimbang adalah :

$$\begin{aligned} \text{g Tris-HCl} &= 3,1512 \text{ g / L} \times 0,2 \text{ L} \\ &= 0,63024 \text{ g} \end{aligned}$$

Kemudian, ditimbang 0,63024 g dan dilarutkan dalam akuades steril sebanyak 100 mL. Lalu, diatur pHnya hingga 6,5 dan ditambahkan kembali akuades steril hingga volumenya mencapai 200 mL.

L.2.11 Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Larutan standar glukosa dibuat dari larutan stok glukosa 100 ppm. Larutan stok glukosa dibuat dengan menimbang glukosa sebesar :

$$\text{Larutan glukosa 100 ppm} = 100 \text{ mg / L} = 10 \text{ mg / 100 mL}$$

Glukosa ditimbang sebanyak 10 mg atau 0.01 gram dan dilarutkan dengan 100 mL akuades steril.

Larutan standar glukosa dibuat dengan mengencerkan larutan stok glukosa 100 ppm menjadi beberapa macam konsentrasi, yaitu :

a. Larutan glukosa 50 ppm

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 50 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

b. Larutan glukosa 45 ppm

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 45 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 4,5 \text{ mL}$$

c. Larutan glukosa 40 ppm

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 40 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 4 \text{ mL}$$

d. Larutan glukosa 35 ppm

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 35 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 3,5 \text{ mL}$$

e. Larutan glukosa 30 ppm

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 30 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 3 \text{ mL}$$

f. Larutan glukosa 25 ppm

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 25 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL}$$

g. Larutan glukosa 20 ppm

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 20 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

h. Larutan glukosa 15 ppm

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 15 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,5 \text{ mL}$$

i. Larutan glukosa 10 ppm

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 10 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL}$$

j. Larutan glukosa 5 ppm

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 5 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

Kemudian, dipipet masing-masing volume larutan stok glukosa 100 ppm, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, dan ditambah akuades sampai tanda batas.

L.2.12 Pembuatan Air Bebas Reduktor

Langkah pertama yang harus dilakukan adalah diambil 500 mL aquadest, dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditambahkan \pm 2 mL KmnO_4 0,1 M hingga larutan berwarna merah muda. Kemudian didestilasi hingga terbentuk larutan yang tak berwarna kembali.

L.2.13 Pembuatan Reagen Nelson

Reagen Nelson terdiri atas 2 jenis, yaitu Nelson A dan B. Dimana cara pembuatannya, yaitu :

a. Nelson A

Mula-mula ditimbang 6,25 gram Na-tartrat $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6,25 gram Na_2CO_3 anhidrat, 5,00 gram NaHCO_3 , dan 50,00 gram Na_2SO_4 anhidrat. Lalu, dilarutkan dengan 100 mL akuades steril, dimasukkan dalam labu ukur 250 mL dan ditambah akuades steril sampai tanda batas.

b. Nelson B

Mula-mula ditimbang 7,50 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan dilarutkan dalam 30 mL akuades steril. Kemudian, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambah akuades steril sampai tanda batas. Kemudian ditambahkan 1 tetes H_2SO_4 dan dicampurkan.

Reagen Nelson A dan B dicampurkan menjadi satu, yaitu dengan dipipet 12 mL Nelson A dan 0,48 mL Nelson B (perbandingan volume 25 : 1) lalu distirer. Pencampuran reagen Nelson A dan B dilakukan tepat saat akan digunakan.

L.2.14 Pembuatan Larutan Substrat Maltosa 56 mM

Mula-mula yang harus dilakukan adalah menimbang Maltosa yang diperlukan, yaitu sebesar :

$$\text{BM Tris-HCl} = 360,3 \text{ g / mol}$$

Untuk membuat larutan Maltosa 56 mM, maka :

$$\begin{aligned} a &= 360,3 \text{ g / mol} \times 56 \times 10^{-3} \text{ mol / L} \\ &= 20,1768 \text{ g / L} \end{aligned}$$

Untuk 50 mL, Maltosa yang harus ditimbang adalah :

$$\begin{aligned} \text{g Maltosa} &= 20,1768 \text{ g / L} \times 0,05 \text{ L} \\ &= 1,00884 \text{ g} \end{aligned}$$

Kemudian, ditimbang 1,00884 g dan dilarutkan dalam larutan Tris-HCl pH 6,5 sebanyak 30 mL. Kemudian dipindahkan dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan larutan Tris-HCl pH 6,5 hingga tanda batas.

L.2.15 Pembuatan Reagen Somogyi (arsenomolibdat)

Mula-mula ditimbang 25 gram ammonium molibdat, dilarutkan dalam 450 mL aquadest steril dan ditambahkan 25 mL H₂SO₄. Kemudian pada tempat yang berbeda, ditimbang 3,00 gram NaHAsO₄ · 7H₂O dan dilarutkan dalam 25 mL akuades steril. Lalu, dicampurkan larutan kedua dalam larutan pertama dan dimasukkan dalam botol berwarna gelap serta diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

L.2.16 Pembuatan Larutan APS 10%

Larutan APS 10% dibuat dengan ditimbang 0,5 gram ammonium persulphate dan dilarutkan dengan 5 mL aquadest steril. Kemudian, divorteks serta disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

L.2.17 Pembuatan Larutan Poliakrilamida (T-Akriil)

Mula-mula ditimbang 2,92 gram akrilamida dan 0,0801 gram bisakrilamida, lalu dilarutkan dengan 7 mL aquadest steril dengan distirer. Kemudian, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan di tambah akuades steril sampai tanda batas.

L.2.18 Pembuatan Larutan Upper Gel Buffer pH 6,8

Mula-mula ditimbang 0,75 gram Tris-base dan 0,0401 gram SDS, kemudian dilarutkan dengan 5 mL aquadest steril. Lalu, diatur pHnya hingga 6,8. Selanjutnya, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan di tambah akuades steril sampai tanda batas.

L.2.19 Pembuatan Larutan Lower Gel Buffer pH 8,8

Pertama ditimbang 1,32 gram Tris-base dan 0,0401 gram SDS, lalu dilarutkan dengan 5 mL aquadest steril dengan distirer serta diatur pHnya hingga 8,8. Kemudian, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan di tambah akuades steril sampai tanda batas.

L.2.20 Pembuatan Running Buffer

Mula-mula ditimbang 3,03 gram Tris-base, 14,40 gram glisin dan 1,00 g SDS, lalu dilarutkan dalam 1 L akuades steril.

L.2.21 Pembuatan Larutan Reducing Sample Buffer (RSB)

Mula-mula diambil dengan mikropipet 0,125 μL UGB, 0,2 μL gliserol, 0,2 μL SDS, 0,05 μL β -merkaptotanol dan 0,025 μL Bromophenol Blue, lalu diencerkan dengan 400 μL akuades steril.

Tabel L.2.1 Komposisi Larutan Separating Gel 12% (1 plate)

Bahan	Volume
LGB	1300
T-akril	2000
dd H ₂ O	1700
APS 10%	70
TEMED	7

Tabel L.2.2 Komposisi Larutan Stacking Gel 3% (1 plate)

Bahan	Volume (μL)
UGB	415
T-akril	267
dd H ₂ O	975
APS 10%	20
TEMED	2

L.2.22 Pembuatan Larutan Pewarna (Staining)

Pertama-tama ditimbang 0,2501 gram Commasive Brilliant Blue R-250, dilarutkan dengan 45,4 mL metanol 99,9% dan 9,2 mL asam asetat glasial. Lalu ditambah dengan akuades steril hingga volumenya mencapai 100 mL

L.2.23 Pembuatan Larutan Panghilang Warna (Destaining)

Mula-mula dipipet 7 mL asam asetat glasial dan 7 mL metanol 99,9%, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan di tambah akuades steril sampai tanda batas.

L.2.24 Pembuatan Etanol Bertingkat

Larutan etanol bertingkat dibuat dari larutan etanol absolut 98%, yang kemudian diencerkan menjadi 95%, 90%, 80%, 70% dalam labu ukur 100 mL. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan akuades steril.

Contoh pembuatan larutan etanol 95% dibuat dari larutan etanol absolut, dimana untuk membuat etanol 95% maka volume etanol absolut yang diperlukan sebesar :

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$
$$98\% \cdot V_1 = 95\% \cdot 100 \text{ mL}$$
$$V_1 = 96,9 \text{ mL}$$



Lampiran 3. Diagram Alir

L.3.1 Isolasi Enzim Maltase



L.3.2 Uji Aktivitas Enzim Maltase

L.3.2.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

1 mL Larutan Standart Glukosa 40
µg/mL

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan 1 mL air bebas reduktor dan 1 mL reagen Nelson
- ditutup mulut tabung reaksi dengan aluminium foil
- dipanaskan dalam penangas air dengan suhu 80°C selama 20 menit
- didinginkan hingga mencapai suhu ruang
- ditambahkan 1 mL reagen Somogyi (arsenomolibdat)
- dihomogenkan dengan vorteks hingga endapan larut
- didiamkan selama 2 menit
- dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL
- ditambahkan air bebas reduktor hingga tanda batas
- diukur absorbansinya pada range λ 500-800 nm hingga diperoleh absorbansi maksimum

Data

L.3.2.2 Pembuatan Kurva Baku Glukosa Metode Nelson-Somogyi

1 mL Larutan Standart Glukosa (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40)
 $\mu\text{g/mL}$

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda
- ditambahkan 1 mL air bebas reduktor dan 1 mL reagen Nelson
- dipanaskan dalam penangas air dengan suhu 80°C selama 20 menit
- didinginkan hingga mencapai suhu ruang
- ditambahkan 1 mL reagen Somogyi (arsenomolibdat)
- dihomogenkan dengan vorteks hingga endapan larut
- didiamkan selama 2 menit
- dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL
- ditambahkan air bebas reduktor hingga tanda batas
- diukur absorbansinya pada λ maksimumnya

Data

L.3.2.3 Penentuan Aktivitas Enzim Maltase

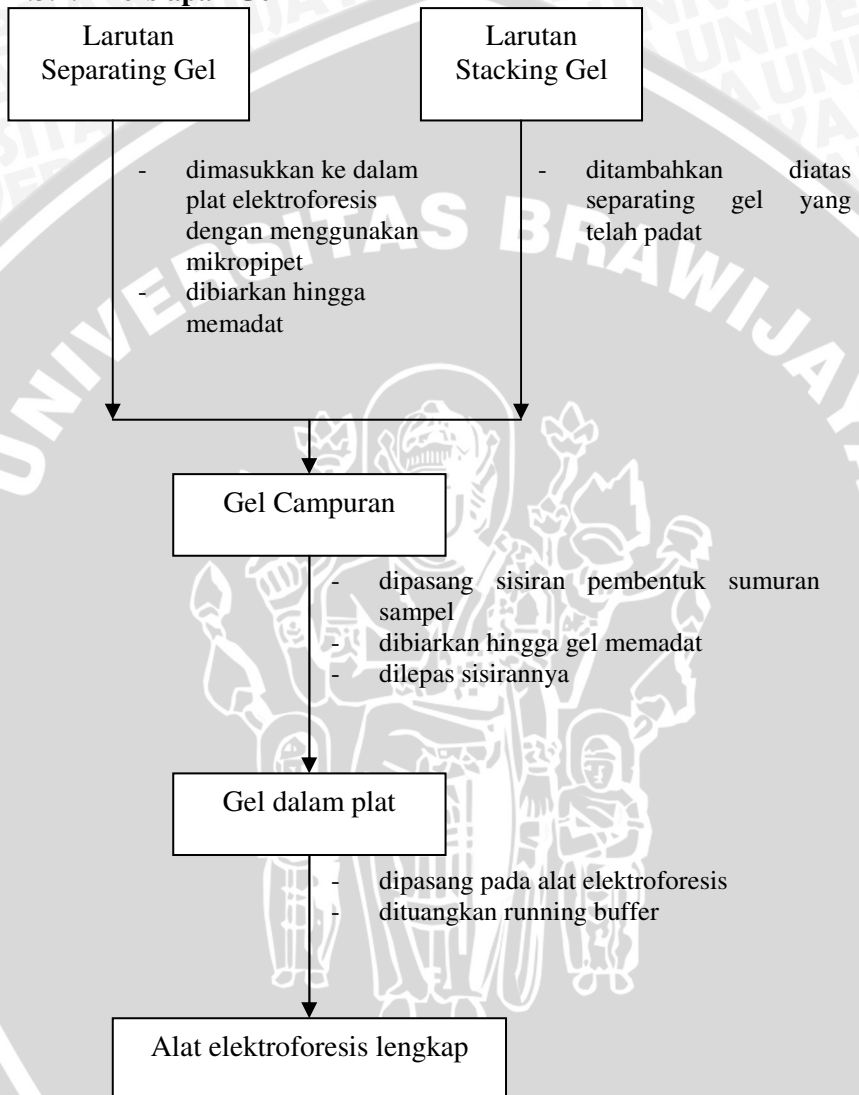
Crude enzim Maltase

- diambil 4 μL dan ditambahkan 36 μL Tris Cl
- ditambahkan 100 μL substrat maltosa 56 mM
- diinkubasi selama 15 menit pada 37°C dengan pH 6.5
- ditambahkan 1000 μL air bebas reduktor dan 1000 μL reagen Nelson
- ditutup mulut tabung dengan aluminium foil
- dipanaskan dalam penangas air dengan suhu 80°C selama 20 menit
- didinginkan hingga mencapai suhu ruang
- ditambahkan 1000 μL reagen Somogyi (arsenomolibdat)
- dihomogenkan dengan vorteks hingga endapan larut
- dipindahkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan air bebas reduktor hingga tanda batas
- diukur absorbansinya pada λ maksimumnya

Data

L.3.4 Profil Protein dengan Tehnik SDS-PAGE

L.3.4.1 Persiapan Gel



L.3.4.2 Injeksi Sampel dan Running

120 μ L Crude Enzim maltase

- dimasukkan dalam tabung mikro
- ditambah dengan 20 μ L RSB (perbandingan volume 1:1)
- dipanaskan pada suhu 100°C selama 2 menit pada waterbath
- didinginkan pada suhu ruang
- disuntikkan ke dalam 10 sumuran @ 20 μ L
- dilakukan running dengan arus 28 mA, 128 V hingga warna biru berada \pm 0,5 cm dari batas bawah plat gel

Gel hasil running

- direndam dalam larutan staining sambil dikocok menggunakan shaker selama 20 menit
- direndam dalam larutan destaining sambil dikocok menggunakan shaker hingga pita pada gel tampak jelas

Pita-pita pada gel hasil elektroforesis

- ditentukan harga R_f dan berat molekulnya masing-masing

Data

L.3.4 Embedding Jejunum

Jejunum dalam PFA 10%

- diambil dan direndam dalam etanol selama 24 jam
- dimasukkan dalam etanol 80% selama 2 jam
- dimasukkan dalam etanol 90% selama 20 menit
- dimasukkan dalam etanol 95% selama 20 menit
- dipindahkan dalam etanol absolut selama 20 dan diulang sebanyak 3 kali

Jejunum hasil dehidrasi dengan etanol

- dimasukkan dalam larutan xilol selama 20 menit, sebanyak 2 kali pada suhu ruang
- dimasukkan dalam larutan xilol selama 30 menit pada suhu 60-63°C
- dicelupkan dalam parafin cair
- embedding blok paraffin
- didinginkan pada suhu 4°C

Jejunum dalam blok parafin

L.3.5 Pembuatan Preparat Jejunum

Jejunum dalam blok parafin

- diiris seukuran 5 μm
- didinginkan pada suhu ruang
- dimasukkan dalam air hangat dengan suhu 38-40°C
- diambil dengan objek glass
- dikeringkan di atas hot plate dengan suhu 38-40°C
- diinkubasi pada suhu 38-40°C selama 24 jam

Preparat disimpan pada suhu ruang



L.3.6 Pewarnaan Hematoxylen-Eosin

Preparat

- dideparafinasi dengan xilol selama 5 menit (3 kali)
- dimasukkan dalam etanol absolute selama 5 menit (3 kali)
- dimasukkan dalam etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%) @ selama 5 menit lalu direndam dalam aquadest

Preparat

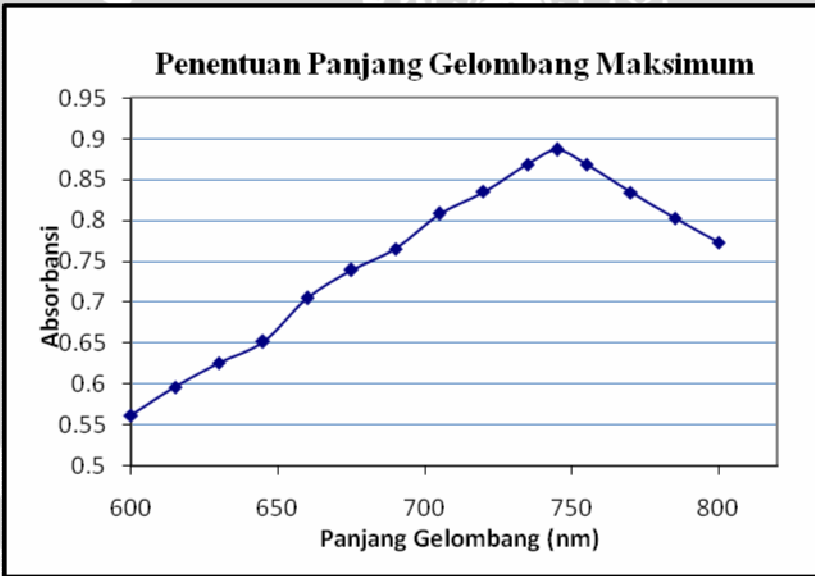
- diwarnai dengan Hematoxylen selama 10 menit atau hingga diperoleh hasil yang terbaik
- dicuci air mengalir dan dibilas aquadest
- diwarnai dengan Eosin selama 5 menit lalu direndam dalam aquadest
- dimasukkan dalam etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) @ selama 10 menit
- dimasukkan dalam etanol absolute selama 5 menit (3 kali)
- dimasukkan dalam xylol selama 5 menit (2 kali)
- dikering anginkan
- dimounting dengan menggunakan entellan dan ditutup cover glass

Preparat HE

Lampiran 4. Penentuan λ Maksimum Larutan Glukosa

Tabel L.4.1 Absorbansi Larutan Glukosa 4 ppm pada berbagai Panjang Gelombang

λ (nm)	Absorbansi	λ (nm)	Absorbansi
600	0,5621	720	0,8355
615	0,5966	735	0,8689
630	0,6258	745	0,8870
645	0,6521	755	0,8691
660	0,7053	770	0,8341
675	0,7398	785	0,8027
690	0,7652	800	0,7732

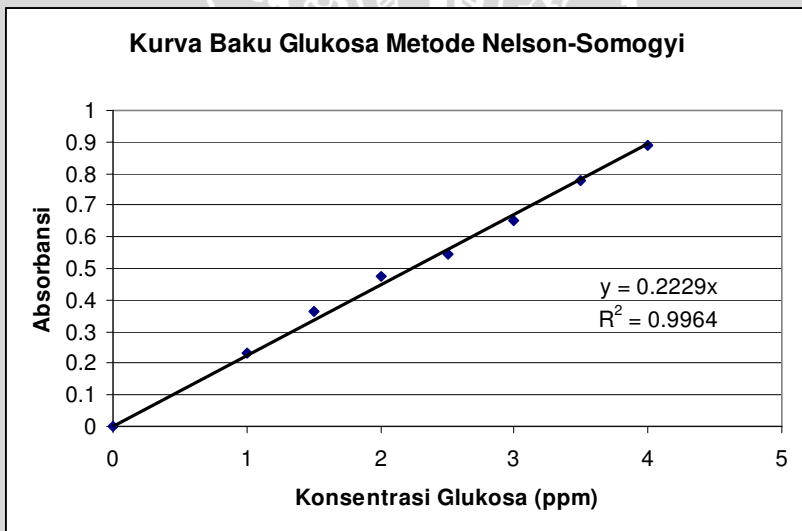


Gambar L.7.1 Kurva Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Glukosa 4 ppm

Lampiran 5. Kurva Baku Larutan Glukosa dengan Metode Nelson-Somogyi

Tabel L.5.1 Absorbansi Larutan Glukosa pada $\lambda=745$ nm

[Glukosa] ppm	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi rata-rata
0	0	0	0
1	0,234	0,232	0,233
1,5	0,363	0,365	0,364
2	0,472	0,474	0,473
2,5	0,547	0,545	0,546
3	0,654	0,652	0,653
3,5	0,777	0,775	0,776
4	0,888	0,886	0,887



Gambar L.8.1 Kurva Baku Glukosa dengan Metode Nelson-Somogyi pada $\lambda= 745$ nm

Lampiran 6. Aktivitas Maltase pada Crude Enzim

Tabel L.6.1 Aktivitas Maltase (pH 6,5, suhu 37°C, waktu inkubasi 15 menit)

Sampel	ulangan	Absorbansi	(glukosa) µg/mL	Aktivitas µmol/mL menit (U)	Aktivitas Rata-rata µmol/mL menit (U)
K1	1	0,8447	3,79	21,87	21,89
K2	2	0,8451	3,79	21,88	
K3	3	0,8473	3,80	21,93	
K4	4	0,8453	3,79	21,88	
K5	5	0,8451	3,79	21,88	
LPS1	1	0,7358	3,30	19,05	19,05
LPS2	2	0,7364	3,30	19,06	
LPS3	3	0,7370	3,30	19,08	
LPS4	4	0,7349	3,30	19,02	
LPS5	5	0,7349	3,30	19,03	

Contoh: Perhitungan aktivitas Maltase pada (pH 6,5; T 37°C; t = 15 menit) dengan absorbansi 0,8447

$$Y = 0,2229 X$$

$$0,8447 = 0,2229 X$$

$$X = 21.8665 \text{ mg/L}$$

$$X = 21.8 \text{ µg/mL}$$

Nilai X merupakan konsentrasi glukosa hasil hidrolisis, untuk menentukan aktivitas enzim Maltase maka satuan glukosa dikonversikan menjadi µmol/mL dengan rumus :

$$\text{Unit aktivitas} = \frac{[\text{glukosa}]}{\text{BM glukosa}} \times \frac{V}{p \cdot q} \times fp$$

Dimana:

V = Volume total sampel dalam percobaan pada tiap tabung (ml)

p = Volume Maltase (ml)

q = Waktu reaksi (menit)

fp = Faktor pengenceran = 100

BM = Berat molekul glukosa (180,157 µg/µmol)

$$\begin{aligned}
 \text{Aktivitas} &= \frac{3,7447 \mu\text{g/mL} \times 3120 \cdot 10^{-3} \text{ mL} \times 100}{180,157 \mu\text{g}/\mu\text{mol} \times 20 \cdot 10^{-3} \text{ mL} \times 10 \text{ menit}} \\
 &= 21.8665 \mu\text{mol/mL.menit} \\
 &= 21.8665 \text{ Unit} \\
 &= 21.87 \text{ Unit}
 \end{aligned}$$

Satu unit aktivitas Maltase dinyatakan dengan jumlah banyaknya μmol glukosa yang dihasilkan oleh reaksi hidrolisis Maltosa 56 mM dengan 3,12 mL enzim Maltase pada suhu 37°C dan pH 6.5 untuk setiap menitnya. Sehingga didapat aktivitas Maltase sebesar 21,87 Unit.

Lampiran 7. Data dan Uji Statistik Aktivitas Maltase Ekstrak Kasar Maltase

Tabel L.7.1 Penentuan T_{hitung} pada Aktivitas Maltase

Sampel	Aktivitas ($\mu\text{g/mL}$)					Total	Aktivitas Rata-rata (u)
	1	2	3	4	5		
Kontrol	21,87	21,88	21,93	21,88	21,88	109,44	21,89
LPS	19,05	19,06	19,08	19,02	19,03	19,05	19,05
Jumlah							40,94

Uji T dilakukan dengan membandingkan dua nilai tengah dengan ragam dan ulangan berbeda. Tahapannya, yaitu :

$$\text{Hipotesis : } H_0 = \overline{\text{kontrol}} = \overline{\text{LPS}}$$

$$H_1 = \overline{\text{kontrol}} \neq \overline{\text{LPS}}$$

- Menentukan Nilai Tengah

$$\begin{aligned}
 \text{a. } \overline{\text{kontrol}} &= \frac{\sum AE_{\text{kontrol}}}{n_{\text{kontrol}}} = \frac{21,87 + 21,88 + 21,93 + 21,88 + 21,88}{5} \\
 &= 21,89
 \end{aligned}$$

$$S^2_{\text{kontrol}} = \frac{JK_{\text{kontrol}}}{db_{\text{kontrol}}} = \frac{(21,87^2 + 21,88^2 + 21,93^2 + 21,88^2 + 21,88^2) - (109,43^2/5)}{5-1} = 7,04 \times 10^{-4}$$

$$b. \frac{\overline{LPS}}{n_{LPS}} = \frac{\sum AE_{LPS}}{n_{LPS}} = \frac{19,05 + 19,06 + 19,08 + 19,02 + 19,03}{5} = 19,05$$

$$S^2_{LPS} = \frac{JK_{LPS}}{db_{LPS}} = \frac{(19,05^2 + 19,06^2 + 19,08^2 + 19,02^2 + 19,03^2) - (95,24^2/5)}{5-1} = 5,7 \times 10^{-4}$$

2. Menentukan Galat Baku Nilai Tengah

$$S_{(\text{kontrol}-\overline{LPS})} = \sqrt{S^2_{\text{kontrol}} + S^2_{LPS}} = \sqrt{\frac{S^2_{\text{kontrol}}}{n_{\text{kontrol}}} + \frac{S^2_{LPS}}{n_{LPS}}} = \sqrt{\frac{7,04 \times 10^{-4}}{5} + \frac{5,7 \times 10^{-4}}{5}} = \sqrt{2,548 \times 10^{-4}} = 1,59 \times 10^{-2}$$

3. Menentukan t_{hitung}

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{kontrol} - \overline{LPS}}{S_{(\text{kontrol}-\overline{LPS})}} = \frac{21,89 - 19,05}{1,59 \times 10^{-2}} = 178,62$$

Keterangan : AE = aktivitas enzim
n = jumlah pengulangan

$$t_{\text{tabel } 1\%} = t_{0,01(n_{\text{kontrol}}-1+n_{LPS}-1)} = t_{0,01(4+4)} = t_{0,01(8)} = 2,896$$

Analisis Statistika

Sampel	db	$t_{\text{tabel}(0,01)}$	t_{hitung}
Kontrol + LPS	8	2,896	178,62

Dari analisis tersebut maka dapat disimpulkan bahwa aktivitas Maltase pada kontrol dan LPS *berbeda nyata*. Jadi LPS berpengaruh terhadap aktivitas maltase dengan nilai yang signifikan.

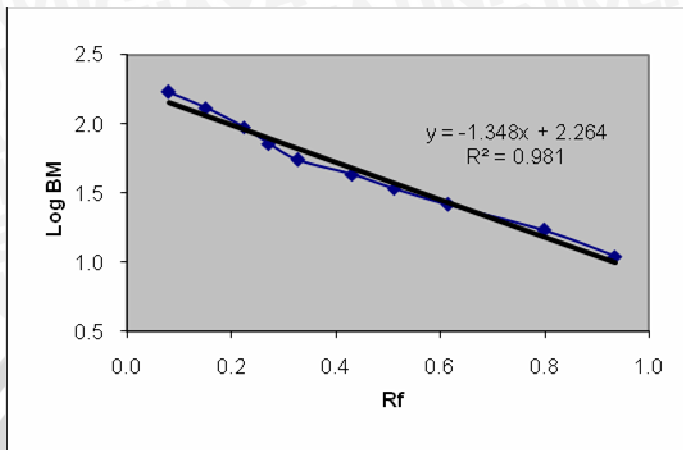
Lampiran 8. Pembuatan Kurva Berat Molekul (BM) Protein Standar

Penentuan berat molekul maltase pada ekstrak kasarnya dilakukan dengan bantuan protein standar. Dimana terlebih dahulu dibuat kurva berat molekul protein standar yang menghubungkan antara log BM sebagai sumbu Y dan Rf (*Retardation Factor*) sebagai sumbu X. Harga BM untuk protein standar telah diketahui sebelumnya, sehingga harga log BM juga dapat ditentukan. Untuk harga Rf protein standar harus ditentukan pada masing-masing pita protein standar yang terbentuk, dimana Rf ditentukan dengan (Sumitro,1996):

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal}}$$

Tabel L.8.1 Harga Rf dan Berat Molekul (BM) Protein Standar

A (pita)	B (gel)	Rf (sb. x)	Log BM (sb. y)	BM (KDa)
1	12,5	0,0800	2,23	170
1,9	12,5	0,1520	2,11	130
2,8	12,5	0,2240	1,98	95
3,4	12,5	0,2720	1,86	72
4,1	12,5	0,3280	1,74	55
5,4	12,5	0,4320	1,63	43
6,4	12,5	0,5120	1,53	34
7,7	12,5	0,6160	1,41	26
10	12,5	0,8000	1,23	17
11,7	12,5	0,9360	1,04	11



Gambar L.8.1 Kurva Berat Molekul (BM) Protein Standar

Lampiran 9. Penentuan Berat Molekul (BM) Maltase dalam Ekstrak Kasar Maltase

Berat molekul maltase dalam ekstrak kasarnya, ditentukan dengan mengplotkan harga Rf dari masing-masing pita protein yang dihasilkan pada setiap sumuran dalam persamaan regresi linier yang diperoleh pada kurva berat molekul protein standar. Berikut ini contoh penentuan berat molekul maltase pada ekstrak kasarnya :

Misal :

$$\begin{aligned}
 R_f &= \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal}} \\
 &= \frac{3,4}{12,5} \\
 &= 0,272
 \end{aligned}$$

Kemudian, harga Rf diplotkan dalam persamaan :

$$\begin{aligned}
 y &= ax + b \\
 y &= - 1,2484x + 2,2514 \\
 &= - 1,2484 (0,272) + 2,2514 \\
 &= 1,9118 \text{ (log BM)}
 \end{aligned}$$

Sehingga diperoleh berat molekul Maltase sebesar anti log 1,9118 = 81kDa.

Tabel L.9.1 Harga Berat Molekul Protein pada Ekstrak Kasar Maltase

sampel	pita	a	b	Rf	Log BM	BM
K1	1	1,4	12,5	0,1138	2,1106	129
K2	2	1,9	12,5	0,1480	2,0645	116
K3	3	2,7	12,5	0,2123	1,9777	95
K4	4	3,4	12,5	0,272	1,9118	81
K5	5	3,9	12,5	0,3153	1,8388	69
	6	5,6	12,5	0,4459	1,6628	46
	7	6,1	12,5	0,4909	1,6021	40
	8	6,6	12,5	0,5248	1,5563	36
	9	6,7	12,5	0,5339	1,5441	35
	10	7,3	12,5	0,5835	1,4771	30
	11	7,4	12,5	0,5944	1,4624	29
	12	7,6	12,5	0,6080	1,4441	28
	pita	a	b	Rf	Log BM	
LPS1	1	1,2	12,5	0,0992	2,1303	135
LPS2	2	1,4	12,5	0,1138	2,1106	129
LPS3	3	1,9	12,5	0,1480	2,0645	116
LPS3	4	2,7	12,5	0,2123	1,9777	95
LPS4	5	3,4	12,5	0,272	1,9118	81
LPS5	6	3,9	12,5	0,3153	1,8388	69
	7	5,6	12,5	0,4459	1,6628	46
	8	6,6	12,5	0,5248	1,5563	36
	9	6,7	12,5	0,5339	1,5441	35
	10	7,3	12,5	0,5835	1,4771	30

Lampiran 8: Sertifikat Layak Etik dari Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 07-KE

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : AKTIVITAS MALTASE HASIL ISOLASI DARI
JEJUNUM TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG
TERPAPAR OLEH LPS (*LIPOPOLISAKARIDA*)

PENELITI : ASTI RAHMANITA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : JURUSAN KIMIA, FMIPA
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 30 Juni 2008
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 131 759 594