

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Alat dan Bahan Penelitian

##### 3.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus berupa kotak berukuran 31x10x40 cm, yang masing-masing berisi 6 ekor tikus yang diberi pakan dan minum. Sonde yang dipasang di ujung spuit, tabung *polypropylene*, *vortex*, gunting, pinset, *multi channel*, *micro tube*, seperangkat alat gelas, spuit, neraca analitik, penangas air, Glukometer digital (Easy Touch GPU), GlucoDr™ Test Strip, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, cawan petri, spatula, alat bedah, *magnetic stirrer*, *hot plate*, *sentrifuge*, mortar, alu, kuvet, *spectrofotometer uv-vis*, *blood lancet*, nampan bedah, kuas kecil, gelas arloji, refrigerator, vacu tube, set alat elektroforesis

##### 3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini akar pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) yang didapatkan dari Lombok Tengah – Nusa Tenggara Barat. Sampel yang didapatkan selanjutnya akan digunakan sebagai uji kadar glukosa pada tikus Diabetes Melitus tipe I. Bahan lain yang digunakan adalah aquades, *Streptozotcin* (STZ),  $\beta$ dine, alkohol 70 % untuk desinfektan, buffer sitrat pH 4.5 0,1 M, larutan NaCl Fisiologis 0,9%, PBS (*Phosphate Buffer Saline*), larutan PFA (Paraformaldehid) 4%, pasir kuarsa, PBS-Tween : PMSF (9:10), buffer tris: HCL (1:1), *working solution*, *dilution buffer*, larutan enzim, *aluminium foil*, *Separating gel* dibuat dari *Lower Gel Buffer* (LGB), T-Acryl, akuades, *Ammonium persulphate* (APS), *N, N, N', N', -tetramethyl ethylene diamine* (TEMED), *Stacking gel* dibuat dari *Upper Gel Buffer* (UGB), T-Acryl, APS, dan TEMED, *running buffer*, *Reducing Sample Buffer* (RSB), *protein standart marker*, larutan *staining*, larutan *destaining*, EDTA.

## 3.2 Tahapan Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada Desember 2016 sampai dengan April 2017 dengan tahapan dari penelitian sebagai berikut:

1. Penyiapan hewan coba (tikus putih *Rattus norvegicus* strain Wistar)
2. Aklimatisasi hewan coba selama 14 hari
3. Pembuatan ekstrak n-heksana pletakan sebagai obat herbal
4. Uji fitokimia ekstrak n-heksana akar pletakan
5. Pengukuran kadar glukosa darah pada hewan coba
6. Pembuatan larutan MLD-STZ
7. Injeksi MLD-STZ secara intraperitoneal pada hewan coba selama 5 hari
8. Inkubasi hewan coba selama 14 hari
9. Terapi hewan coba kelompok DM dan normal dengan terapi dengan menggunakan ekstrak n-heksana akar pletakan
10. Euthanasi, pengambilan organ
11. Analisa aktivitas protease dan profil protein ginjal
12. Analisa data

## 3.3 Prosedur Penelitian

### 3.3.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasikan terhadap lingkungan selama 14 hari. Tikus ditempatkan pada bak plastik yang berukuran 31x10x40 cm yang dilengkapi penutup kawat serta tempat minum, kandang yang mudah dibersihkan, berlokasi di tempat yang bebas dari suara gaduh serta terjaga dari polutan dengan pemberian pakan yang mengandung karbohidrat, protein, lemak, mineral, vitamin dan air.

### 3.3.2 Pembuatan Ekstrak n-heksana Akar *Ruellia Tuberosa L.*

Akar pletakan (*Ruellia Tuberosa L.*) dicuci bersih hingga tidak ada kotoran. Kemudian di keringkan terlebih dahulu, lalu dipotong kecil-kecil. Lalu, akar pletakan (*Ruellia Tuberosa L.*) dihaluskan hingga diperoleh serbuk akar pletakan (*Ruellia Tuberosa L.*) sebanyak 1 kg. Kemudian serbuk akar pletakan (*Ruellia Tuberosa L.*) dimaserasi dengan pelarut n-heksan sebanyak 2 L . Larutan maserasi dilakukan pengadukan setiap 1

jam untuk 5 jam pertama, setelah itu didiamkan hingga 48 jam. Ekstrak cair yang diperoleh didekantasi hingga terpisah dari endapannya. Setelah itu, ekstrak cair diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, 70 rpm hingga diperoleh ekstrak kental akar pletekan (*Ruellia Tuberosa* Linn).

### **3.3.3 Uji Fitokimia Ekstrak Akar *Ruellia Tuberosa* Linn**

Uji fitokimia berfungsi untuk mengetahui senyawa bahan alam apa saja yang terkandung dalam ekstrak n-heksana akar pletekan. Uji fitokimia dibagi menjadi 3 macam yaitu, uji flavonoid, steroid dan terpenoid. Untuk keberadaan senyawa flavonoid diuji dengan cara serbuk akar pletekan sebanyak 10 gram ditambah 50 mL aquades lalu dipanaskan hingga larutan berubah warna menjadi coklat kemerahan. Lalu didiamkan, kemudian dipisahkan ekstrak airnya dengan ampasnya. Ekstrak ditambah dengan etanol 96% sebanyak 5 mL di dalam tabung reaksi kemudian dipanaskan pada suhu 50°C selama 5 menit lalu didinginkan. Setelah itu, ditambahkan HCl pekat sebanyak 1-3 tetes dan ditambahkan bubuk Mg sebanyak 0.2 gram. Ekstrak akan menunjukkan hasil positif mengandung flavonoid dengan terjadinya perubahan warna larutan menjadi warna merah tua.

Untuk uji terpenoid dilakukan dengan cara, ekstrak akar pletekan ditambah dengan asam asetat glasial dan dibiarkan selama 15 menit. Larutan campuran diambil sebanyak 6 tetes dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Dan ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat sebanyak 2-3 tetes. Ekstrak menunjukkan hasil positif mengandung terpenoid dengan terjadinya perubahan warna larutan menjadi warna merah kecoklatan. (Adanya steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru).

### **3.3.4 Pembuatan Larutan Streptozotocin dan Injeksi Intraperitoneal**

*Streptozotocin* 201 mg dilarutkan pada buffer sitrat pH 4.5 sebanyak 3 mL, kemudian di vortex agar homogen, larutan yang sudah dihomogenkan disesuaikan dengan berat badan tikus. Pengambilan larutan STZ untuk injeksi tikus disesuaikan dengan jumlah berat badan tikus (sesuai perhitungan) selanjutnya larutan STZ akan disimpan pada suhu 4 °C. besarnya dosis STZ yang

digunakan sebanyak 20 mg/kg BB per hari selama 5 hari berturut-turut (**Lampiran B.1**). Hewan diposisikan menghadap ke arah ventral hingga terlihat bagian abdomennya, kemudian di semprotkan alcohol 70% di bagian abdomennya, kulit abdomen di cubit, selanjutnya spuit insulin yang berisi larutan STZ di injeksikan secara intraperitoneal. Tikus DM di tandai dengan kadar glukosa  $\geq 200$  mg/dL.

### **3.3.5 Pengukuran Kadar Glukosa darah pada Hewan Coba**

Darah tikus diambil sebelum diinjeksi MLD-STZ untuk mengetahui kadar glukosa awal dalam darah sebelum terkena DM. kadar glukosa darah dicek dengan menggunakan glucometer digital (glucotest). Stick glucometer dan glucometer digital disiapkan sesuai dengan penunjuk penggunaan. Ujung ekor ditusuk menggunakan *blood lancet*. Darah dari ekor diteteskan pada stick glucometer dan ditunggu hasil yang tertera pada layar glucometer digital. Proses pengecekan kadar glukosa ini dilakukan setiap kali pemeriksaan glukosa, yaitu sebelum dan setelah penyuntikkan MLD-STZ (kadar glukosa darah melebihi 200mg/dL, tikus dinyatakan DM), dan setelah diterapi dengan ekstrak air rebusan akar pletakan

### **3.3.6 Terapi Ekstrak n-heksana Akar Pletakan pada Tikus DM**

Hewan terapi dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok 1 sebagai kontrol negatif, kelompok 2 sebagai kontrol positif,, kelompok 3 sebagai kontrol positif dengan terapi 250mg/kg BB yang dilarutkan dalam 2mL minyak jagung dan kelompok 4 sebagai kontrol positif dengan terapi 500mg/kg BB yang dilarutkan dalam 2mL minyak jagung. Masing-masing tikus yang di terapi melalui oral (sonde) sebanyak 250mg/kg BB yang dilarutkan dalam 2mL minyak jagung untuk kelompok 3 dan 500mg/kg BB yang dilarutkan dalam 2mL minyak jagung untuk kelompok 4 per tikus sekali sehari selama 14 hari kemudian dibedah.

### **3.3.7 Pengambilan Organ**

Pengambilan organ tikus (*Rattus novergicus*) dilakukan dengan melakukan pembedahan. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus di eutanasi dengan cara dislokasi leher. Alat bedah disiapkan

untuk pengambilan organ. Setelah tikus mati, tikus diletakkan pada nampan bedah dan diletakkan pada posisi ventro dorsal. Selanjutnya dibuka pada bagian abdomen dan diambil organ dan dicuci dengan NaCl-Fisiologis lalu direndam dalam larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS) Azida.

### **3.3.8 Isolasi Protein pada Ginjal**

Organ ginjal ditimbang sebanyak 0,3 gram. Ditambah sedikit pasir kuarsa dan digerus dengan mortar dingin yang diletakkan diatas blok es. Setelah itu homogenat ditambah dengan larutan PBS-Tween : PSMF (9 :1) sebanyak 1500  $\mu$ L dan dipindahkan ke dalam tabung *ependroff*. Kemudian dihomogenkan dengan alat getar vorteks selama 10 menit, disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan di putar dengan alat sentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm) dengan suhu 25  $^{\circ}$ C. Selanjutnya supernatannya diambil sebanyak 500  $\mu$ L dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama 24jam hingga terbentuk endapan. Setelah itu diputar selama 15 menit (10.000 rpm) dengan suhu 4  $^{\circ}$ C, diambil endapannya dan dikering-anginkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah dengan larutan Tris-HCl pH 6,5 0,02 M dingin sebanyak 200  $\mu$ L dan dilakukan homogenasi, sehingga didapatkan isolat protein mengendap pada bagian bawah tabung polipropilen

### **3.3.9 Penentuan Aktivitas Protease**

#### **3.3.9.1 Pembuatan Kurva Baku Tirosin**

Disiapkan 10 labu ukur dan masing-masing diisi larutan baku tirosin dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ppm. Setelah itu ditambah akuades sampai tanda batas kemudian tabung ditutup dengan alumunium foil lalu dikocok. Selanjutnya di ukur serapannya pada masing-masing konsentrasi larutan baku pada  $\lambda$  maksimal = 275 nm. Blanko yang digunakan adalah akuades.

#### **3.3.9.2 Pengukuran Aktivitas Enzim Protease**

Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan dengan melakukan isolase protease terlebih dahulu. Setelah mendapatkan

protease dari ginjal, membuat kurva baku tirosin untuk mengetahui panjang gelombang maksimal. Selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas protease hasil isolasi protease dari ginjal tikus [Walter, 1984]. Langkah awal yang harus dilakukan adalah mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 100  $\mu$ L dan 150  $\mu$ L larutan bufer fosfat 0,1 M dan 50  $\mu$ L ekstrak kasar protease, dibungkus aluminium foil. Dan didinkubasi selama 60 menit pada suhu 37  $^{\circ}$ C. Kemudian ditambahkan 200  $\mu$ L larutan TCA 4%, didiamkan selama 30 menit pada suhu 27  $^{\circ}$ C. Selanjutnya disentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit pada suhu 25  $^{\circ}$ C. Supernatan diambil 200  $\mu$ L dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan buffer fosfat 0,1 M, diukur nilai absorbansinya pada  $\lambda$  maks tirosin (275 nm). Blanko yang digunakan dibuat dengan prosedur sama dengan penentuan aktivitas, tetapi untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim. Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan berdasarkan metode Walter (1984) menggunakan rumus:

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

Keterangan:

$v$  = volume total sampel (mL)

$q$  = waktu inkubasi (menit)

$f_p$  = factor pengenceran

$p$  = jumlah enzim (mL)

### 3.3.9.3 Analisa Profil Protein pada Ginjal dengan Metode SDS-PAGE

Profil pita protein dianalisa dengan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) yang berfungsi memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya. SDA-PAGE dilakukan dengan tiga tahap yaitu persiapan sampel yang dimulai dengan isolasi protein, kemudian dilanjutkan dengan pembuatan kedua macam gel yaitu *separating gel* dan *stacking gel* sebagai media untuk separasi protein dan tahapan yang ketiga yaitu *running* sampel serum dengan elektroforesis.

### 3.3.9.3.1 Persiapan Gel

Langkah pertama yang harus dilakukan adalah membuat plat gel dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat  $\pm 1$  mm. gel dibuat dua lapis, 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, akuades, ammonium persulphate (APS), N, N, N', N', -tetramethyl ethylene diamine (TEMED) yang dilarutkan menjadi satu dalam akuades steril. Tuangkan ke dalam plate (tempat lapisan gel) menggunakan mikro pipet secara hati-hati dan dibiarkan 15 menit hingga terbentuk gel. Berikutnya tuang *Stacking gel* diatas *separating gel* yang telah memadat sambil dipasang sisir hingga terbentuk gel berikut sumurannya. *Stacking gel* dibuat dari *Upper Gel Buffer* (UGB), T-Acryl, APS, dan TEMED. Dan dilarutkan menjadi satu ke dalam aquades steril. Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati-hati dan plat dipasang pada alat elektroforesis dan dituangkan larutan *running buffer* pada bejana elektroforesis.

### 3.3.9.3.2 Injeksi Sampel dan *Running*

Ekstrak kasar hasil isolasi dari ginjal diambil sebanyak 15  $\mu\text{L}$ , ditambahkan 15  $\mu\text{L}$  *Reducing Sample Buffer* (RSB) dan dipanaskan pada penangas air dengan suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit. Sampel kemudian didinginkan lalu dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel dengan volume 30  $\mu\text{L}$  untuk tiap sumur, dimana salah satu sumuran gel diisi dengan protein standar marker. Tahap selanjutnya yaitu anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan pada reservoir atas dan dihubungkan *power supply* dengan arus listrik konstan 200 Volt selama 45 menit. Dihentikan proses ini jika warna penanda biru berada  $\pm 0,5$  cm dari batas bawah plat gel.

### 3.3.9.3.3 Perlakuan setelah *Running*

Tahap selanjutnya yaitu pewarnaan gel hasil *running* dengan larutan *staining* selama 30-60 menit dengan dikocok menggunakan *shaker*. Penghilangan warna dilakukan dengan

merendam gel dalam larutan *destaining* sambil dishake hingga gel menjadi jernih dan terlihat pita proteinnya.

#### **3.3.9.3.4 Penentuan Berat Molekul**

Tahap terakhir yaitu membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan protein marker, sehingga dapat diketahui jenis-jenis protein dalam ekstrak kasar enzim tersebut. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai  $R_f$  (*Retardation factor*) dari masing-masing pita dengan rumus [44]:

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

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

#### **3.3.9.3.5 Analisis Data**

Data yang diperoleh dari pengukuran uji aktivitas protease akan dianalisis menggunakan uji *ANOVA* dan apabila data tersebut terdapat perbedaan hasil antar perlakuan maka dilakukan analisis dengan *BNJ* (Beda Nyata Jujur) dengan menggunakan aplikasi *SPSS* .