

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Bahan dan Alat Penelitian

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan untuk ransum, bahan kimia. Bahan utama yang digunakan adalah berupa paku air Semanggi (*Marsilea crenata*) dan Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang berjenis kelamin jantan dan berumur 3 bulan. Bahan untuk pembuatan ransum adalah susu sapi murni, HCl, lemak (minyak jagung), *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC), vitamin, mineral *mix*, karbohidrat (tepung maizena), dan lemak babi.

Bahan kimia yang digunakan ialah untuk analisis serat pangan, proksimat, lipid serum, kadar kolesterol dalam feses dan pembuatan preparat. Bahan untuk analisis serat pangan antara lain : 0.1 M Buffer Natrium Fosfat pH 6, 4 M HCl, 4 M NaOH, etanol teknis 95%, etanol 78%, aseton Puriss, Petroleum eter (40 ml/g sampel), enzim Termamyl 60L atau 120L (Novo), Pepesin NF (Merck), dan pankreatin 4 x NF (SIGMA). Bahan untuk analisis proksimat antara lain petroleum ether, kertas saring, aquades, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, HgO, indikator metil merah, NaOH, HCl dan larutan K<sub>2</sub>S.

Bahan untuk analisis kadar lipid serum darah tikus antara lain Good's buffer pH 7.2 dan pH 6.7, 4-Chlorophenol, ATP, Mg<sup>2+</sup>, Glycerokinase (GK), Peroxidase (POD), Lipoprotein Lipase (LPL), 4-Aminoantipyrine, Glycerol-3-phosphate-oxidase (GPO), Phenol, Cholesterol esterase (CHE) serta Cholesterol oxidase (CHO). Bahan untuk analisis kadar kolesterol dalam feses meliputi aseton, alkohol, khloroform, asetat anhidrat, asam sulfat dan kolesterol standar. Bahan untuk pengawetan organ tikus ialah formalin 10 %. Adapun bahan untuk pembuatan preparat meliputi larutan Bouins, alkohol (70%,80%,96%), Xylene, paraffin murni, paraffin cair, aquades, Haematoksilin dan eosin. Dan bahan yang digunakan untuk mengambil gambar histopatologi aorta dan hepar dari preparat ialah minyak emersi.

Bahan untuk analisa imunohistokimia F2-Isoprostan antara lain : Preparat aorta, aceton, bahan pewarnaan imunohistokimia dengan teknik *Avidin Biotin Complex* (hydrogen peroxide

solution, normal goat serum blocking solution, biotinylated goat second antibody, antibody primer terhadap tikus, avidin biotin, kromogen DAB, haemotosilin mayer, mounting solution).

### **3.1.2 Alat Penelitian**

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari peralatan pembuatan tepung semanggi, pembuatan ransum, pemeliharaan tikus, analisis serat pangan, analisis proksimat, analisis lipid serum, analisis kolesterol dalam feses, pembuatan preparat dan pengamatan histopatologi.

Peralatan yang digunakan untuk pembuatan tepung semanggi meliputi baskom plastik, blender, ayakan, dan oven. Sedangkan peralatan yang digunakan untuk membuat ransum pakan tikus antara lain timbangan digital, blender, baskom plastik, loyang, alat penggiling daging dan oven. Peralatan yang digunakan untuk pemeliharaan berupa box persegi panjang, kawat, wadah pakan, botol minum, pipa kaca, karet, timbangan digital.

Peralatan yang digunakan untuk analisis serat pangan adalah *Soxhlet*, timbangan analitik, erlenmeyer 250 ml, penangas air, pH meter, aluminium foil, dan *crucible* (*porosity* 2). Adapun peralatan untuk analisis proksimat seperti timbangan analitik, kertas saring, erlenmeyer, gelas piala, gelas ukur, buret, mortar, rangkaian alat destruksi, pipet volume, statif, bola hisap, spatula, labu destruksi, labu destilasi, peralatan untuk ekstraksi lemak (*soxhlet*), oven, desikator dan muffle.

Peralatan untuk analisis lipid serum dan kolesterol dalam feses serta imunohistokimia F2-Isoprostan meliputi kapas, tabung *appendorf*, *haematocrit*, tabung reaksi, pipet tetes, *appendorf*, vortex, kuvet, sentrifuge, spektrofotometer, timbangan analitik, water bath, sentrifuge, spektrofotometer, tabung reaksi dan pipet. Sedangkan alat-alat yang digunakan untuk pembuatan preparat dan pengambilan gambar histopatologi adalah scalpel, botol kaca kecil, pipet tetes, cassette, dekkel, moldtray, lempengan blok (dibagian worksurf dari Histoembedder), cold plate, mikrotom, objek glass, entelan, cover glass, seperangkat alat pengambilan gambar histopatologi (mikroskop cahaya, dan monitor) dan microtome.

### **3.2 Metode Penelitian**

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Eksperimen adalah suatu cara untuk mencari hubungan sebab akibat (hubungan kausal) antara dua faktor yang sengaja ditimbulkan oleh peneliti dengan mengeliminasi atau mengurangi faktor-faktor lain yang mengganggu. Eksperimen selalu dilakukan dengan maksud untuk melihat akibat dari suatu perlakuan (Arikunto, 2002).

Variabel penelitian adalah gambaran dari sifat suatu benda yang menjadi obyek penelitian dan mempunyai berbagai macam nilai (Nazir, 1989). Variabel dibedakan menjadi dua yaitu variabel bebas dan terikat. Variabel bebas adalah variabel yang dipilih sebagai variabel yang sengaja dipelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel terikat adalah variabel yang menjadi pusat percobaan.

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus yang berjenis kelamin jantan untuk mengetahui pengaruh semanggi terhadap profil serum dan gambaran histopatologi hepar dan aorta. Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian ransum semanggi, sedangkan Variabel terikat yang digunakan adalah laju perubahan profil serum dan gambaran histopatologi aorta dan hepar dikarenakan pemberian semanggi. Disamping itu, dilakukan analisis proksimat pada semanggi meliputi protein, karbohidrat, lemak, abu dan air serta serat pangan.

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap pengaruh pemberian semanggi terhadap perubahan profil serum dan gambaran histopatologi aorta dan hepar, dimana masing-masing diulang sebanyak 10 kali ulangan.

Tabel 3. Rancangan Penelitian

Perlakuan	Ulangan									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9	A 10
B	B 1	B 2	B 3	B 4	B 5	B 6	B 7	B 8	B 9	B 10
C	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8	C 9	C 10

Keterangan :

❖ A : Hewan Uji Normal (Kontrol negatif)

- ❖ B : Hewan Uji Diet Lemak Tinggi + ransum semanggi 0 gr (Kontrol positif)
- ❖ C : Hewan Uji Diet Lemak Tinggi + ransum semanggi 5,48 gr/bb (Perlakuan)

### **3.3 Prosedur Penelitian**

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan, seperti pada skema kerja. Adapun tahapan tersebut antara lain adalah :

#### **3.3.1 Pemodelan Hewan Uji**

Pembuatan tikus kolesterol tinggi dilakukan dengan cara menaikkan kadar lipid tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dengan mengganti ransum normal dengan ransum berkolesterol, yaitu ransum dengan penambahan lemak babi jenuh. Ransum berkolesterol diberikan selama 30 hari. Namun kondisi kolesterol berlebih sudah dapat dicapai pada hari ke-6 setelah tikus mengkonsumsi ransum berkolesterol (Wirawan, 2004).

Perlakuan hewan uji sebanyak 30 ekor dibagi menjadi 3 kelompok yang diulang 10 kali. Kelompok A diberi ransum normal dan kelompok B diberi ransum diet lemak tinggi selama 45 hari. Sedangkan kelompok C diberi diet lemak tinggi selama 1 bulan untuk membentuk hewan uji mengalami kondisi kolesterol berlebih. Setelah itu, tikus kelompok C tersebut diberi perlakuan berbeda yaitu selama 15 hari kemudian 10 ekor tikus diberi ransum semanggi. Adapun komposisi ransum diet lemak tinggi adalah karbohidrat 63%, protein 10%, lemak 15%, mineral *Mix* 5%, serat 1%, vitamin 1% dan Air 5%.

#### **3.3.2 Pembuatan Tepung Semanggi**

Semanggi yang telah di ambil, di keringkan untuk menghilangkan kadar airnya, ditepungkan dengan cara di blender kering hingga halus, lalu di ayak dengan ukuran 30 mesh untuk mendapatkan tepung yang berukuran seragam. Untuk mengetahui komposisi kimia yang terdapat di daun semanggi, maka dilakukan analisa proksimat serta penentuan kandungan serat larut dan tidak larut air.

#### **3.3.3 Analisis proksimat ransum pakan**

##### **a. Kadar air**

Metode yang digunakan untuk penentuan kadar air adalah metode *Thermogravimetri*. Prinsip dari metode ini adalah sampel dipanaskan pada suhu (100-105)<sup>0</sup>C sampai diperoleh berat yang konstan. Pada suhu ini semua air bebas (yang tidak terikat pada zat lain) dapat dengan mudah diuapkan, tetapi tidak demikian halnya dengan air yang terikat.

Menurut Sudarmadji *et al.*, (1997) penentuan kadar air dengan menggunakan metode Termogravimetri adalah sebagai berikut:

- Timbang sampel yang berupa serbuk sebanyak 2 gram dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya. Kemudian keringkan dalam oven pada suhu (100-105)<sup>0</sup>C selama semalam, kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang beratnya.
- Pengurangan berat merupakan banyaknya air dalam bahan, dengan perhitungan:

$$\text{Wet bases (wb)} = \frac{(\text{beratbotoltimbang} + \text{beratsampel}) - \text{berataakhir}}{\text{beratsampel}} \times 100\%$$

$$\text{Dry bases (db)} = \frac{(\text{beratbotoltimbang} + \text{berat sampel}) - \text{berat akhir}}{\text{berat akhir} - \text{berat botol timbang}} \times 100\%$$

## **b. Kadar Protein**

Metode yang digunakan untuk penentuan kadar protein adalah metode makro *Kjeldahl*. Prinsip dari metode ini adalah penentuan protein berdasarkan oksidasi bahan-bahan berkarbon dan konversi nitrogen menjadi amonia. Selanjutnya amonia bereaksi dengan kelebihan asam membentuk amonium sulfat. Larutan dibuat menjadi basa, dan amonia diuapkan untuk kemudian diserap dalam larutan asam borat. Nitrogen yang terkandung dalam larutan dapat ditentukan jumlahnya dengan titrasi menggunakan HCl 0,02N (Apriyantono *et al.*, 1989). Menurut Sudarmadji *et al.*, (1997) prosedur penentuan kadar protein dengan menggunakan metode makro Kjeldahl adalah sebagai berikut:

- Timbang 1 g bahan dan masukkan dalam labu Kjeldahl. Kemudian tambahkan 7,5 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 0,35 g HgO dan 15 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Panaskan semua bahan dalam labu Kjeldahl dalam lemari asam sampai mendidih dan cairan jernih. Teruskan pemanasan tambahan lebih kurang 1 jam. Matikan api pemanas dan biarkan menjadi dingin. Kemudian tambahkan 100 ml aquades dalam labu Kjeldahl dan beberapa lempeng Zn,

- juga ditambahkan 15 ml larutan K<sub>2</sub>S 4 % dan akhirnya tambahkan perlahan-lahan larutan NaOH 50% sebanyak 50 ml. Pasanglah labu Kjeldahl dengan segera pada alat destilasi.
- Panaskan labu Kjeldahl perlahan-lahan sampai dua lapisan cairan tercampur, kemudian panaskan dengan cepat sampai mendidih.
  - Destilat ini ditampung dalam Erlenmeyer yang telah diisi dengan 50 ml larutan standar HCl 0,1 N dan 5 tetes indikator metil merah. Lakukan destilasi sampai destilat yang tertampung sebanyak 75 ml.
  - Titrasi destilat yang diperoleh dengan standar NaOH (0,1 N) sampai warna kuning.
  - Buatlah juga larutan blanko dengan mengganti bahan dengan aquades, lakukan destruksi, destilasi dan titrasi seperti pada sampel.
  - Perhitungan :

$$\% \text{ kadar N} = \frac{(\text{ml NaOH blanko} - \text{ml NaOH sampel})}{\text{gram sampel} \times 1000} \times 100 \times 14,008$$

### c. Kadar Lemak

Metode yang digunakan dalam penentuan kadar lemak adalah metode *Soxhlet*. Prinsip dari metode ini adalah ekstraksi atau pemisahan lemak dari contoh dengan cara mensirkulasikan pelarut lemak (*ethyl ether*) ke dalam contoh (Murachman *et al.*, 1980). Menurut Sudarmadji *et al.*, (1997) prosedur penentuan kadar lemak dengan menggunakan metode Soxhlet adalah sebagai berikut:

Labu yang sesuai ukurannya dengan alat ekstraksi soxhlet dikeringkan dalam oven lalu didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Sampel yang sudah dihomogenkan ditimbang sebanyak 2 g. Dibungkus dalam kertas saring dan dimasukkan dalam selongsong sampel dan ditutup dengan kapas bebas sampel. Ekstraksi dilakukan selama 5 jam sampai pelarut yang turun kembali ke labu lemak berwarna jernih. Pelarut yang ada dalam labu yang berisi lemak hasil ekstraksi dipanaskan dalam oven pada suhu 105<sup>0</sup>C. Setelah didapatkan berat yang tetap, lemak dalam labu tersebut didinginkan dalam desikator dan selanjutnya lemak beserta labunya ditimbang. Perhitungan kadar lemak adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ kadar lemak} = \frac{(\text{berat labu} + \text{lemak}) - \text{berat labu}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

#### **d. Kadar Karbohidrat**

Menurut Sudarmadji *et al.*, (1997) metode yang digunakan untuk analisis kadar karbohidrat adalah metode Hidrolisis asam secara langsung. Prinsip dari metode ini adalah menentukan kadar pati dengan menghidrolisis pati dengan asam atau enzim sehingga diperoleh gula reduksi. Kemudian hasil hidrolisis pati tersebut dihitung dengan cara jumlah pati dikalikan dengan faktor konversi sebesar 0,90. Prosedur analisis kadar karbohidrat adalah sebagai berikut:

- Timbang 2 g contoh, tambahkan 50 ml aquades dan aduk selama 1 jam. Suspensi disaring dengan kertas saring dan dicuci dengan aquades sampai volume filtrat 250 ml. Filtrat ini mengandung karbohidrat yang terlarut dan dibuang.
- Untuk bahan yang mengandung lemak, maka pati yang terdapat sebagai residu pada kertas saring dicuci 5 kali dengan 10 ml ether. Biarkan ether menguap dari residu, kemudian cuci lagi dengan 150 ml alkohol 10% untuk membebaskan lebih lanjut karbohidrat yang terlarut.
- Residu dipindahkan secara kuantitatif dari kertas saring kedalam erlenmeyer dengan pencucian 200 ml aquades dan tambahkan 20 ml HCl ± 25%. Tutup dengan pendingin balik, panaskan diatas penangas air mendidih selama 2,5 jam.
- Setelah dingin netralkan dengan larutan NaOH 45% dan encerkan sampai volume 500 ml, kemudian tentukan kadar gula yang dinyatakan sebagai glukosa dari filtrat yang diperoleh. Kemudian berat glukosa dikalikan 0,9 yang hasilnya merupakan berat pati.

#### **e. Kadar abu**

Metode yang digunakan untuk penentuan kadar abu adalah metode pemanasan (pengeringan secara langsung). Tujuan analisa kadar abu adalah untuk menentukan baik tidaknya suatu pengolahan dan sebagai parameter nilai gizi dari tepung agar-agar (*gelidium* spp.) Dan ransum pakan tikus (mengetahui kandungan mineral). Prinsip dari metode ini adalah sampel dipanaskan pada suhu 650°C, maka akan terjadi abu yang berwarna putih

(murachman *et al.*, 1983). Menurut sudarmadji *et al.*, (1997) penentuan kadar abu dengan menggunakan metode pemanasan adalah sebagai berikut:

Timbang 2 g sampel dalam kurs porselen yang telah kering dan telah diketahui beratnya, kemudian pijarkan dalam muffle sampai diperoleh abu berwarna keputih-putihan dengan suhu (550-660) °c. Masukkan kurs yang berisi abu ke dalam desikator dan ditimbang kadar abu setelah dingin. perhitungan kadar abu sebagai berikut :

$$\% \text{ kadar abu} = \frac{\text{Berat akhir} - \text{berat kurs porselen}}{\text{berat sampel kering (gram)}} \times 100 \%$$

### 3.3.4 Analisa Serat Pangan

Berdasarkan metode Sulaeman *et al.* (1993) Sampel dihomogenkan menggunakan gilingan dan disaring dengan ukuran 0,30 mm. Dilakukan ekstraksi lemak menggunakan petroleum eter pada suhu kamar selama 15 menit (40 ml petoleum eter per gram sampel). Satu gram sampel ditimbang dan dimasukkan dalam erlenmeyer lalu ditambahkan 25 ml 0,10 M buffer natrium fosfat pH 6 dan diaduk. Buffer ditambahkan ditujukan untuk menstabilkan enzim termamyl. Ditambahkan 0,10 ml enzim termamyl. Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi dalam penangas air dengan suhu 100°C selama 15 menit sambil diaduk sesekali dengan tujuan untuk menghidrolisa pati dengan menggelatinisasikan terlebih dahulu. Sampel diangkat dan setelah dingin ditambahkan 20 ml air destilata kemudian pH dijadikan 1,5 menggunakan HCl 4 N agar aktivitas enzim pepsin menjadi maksimum. Ditambahkan 100 mg pepsin, erlenmeyer ditutup dan diinkubasi dalam penangas air bergoyang pada suhu 42°C selama 60 menit. Ditambahkan 20 ml air destilat dan atur pH menjadi 6,8 dengan menggunakan NaOH untuk mendapatkan aktivitas maksimum dari pankreatin. Ditambahkan 100 mg pankreatin, erlenmeyer ditutup dan diinkubasi dalam penangas air bergoyang pada suhu 40°C selama 60 menit. Diatur pH menjadi 4,5 menggunakan HCl. Disaring menggunakan *crucible* kering (porositas 2) yang telah diketahui beratnya mengandung 0,5 g *celite* kering. Terakhir dicuci dengan 2 x 10 ml air destilat.

#### 1. *Insoluble Dietary Fiber* (IDF) (residu)



Cuci dengan 2 x 10 ml etanol 95% dan 20 x 10 ml aseton. Dikeringkan pada suhu 105°C sampai mencapai berat konstan (1 malam). Timbang setelah didinginkan dalam desikator (D<sub>1</sub>). Pengabuan pada suhu 550°C minimal selama 5 jam. Ditimbang setelah didinginkan dalam desikator (I<sub>1</sub>).

## 2. Soluble Dietary Fiber (SDF) (filtrat)

Atur volume filtrat menjadi 100 ml dengan air destilat kemudian ditambahkan 400 ml etanol 95% (60°C), biarkan mengendap selama 1 jam. Disaring menggunakan *crucible* (porositas 2) yang telah diketahui beratnya dengan mengandung 0,5 gram *celite*, dicuci dengan 2 x 10 ml etanol 78%; 2 x 10 ml etanol 95%; 2 x 10 ml aseton. Dikeringkan pada suhu 105°C selama semalam. Timbang setelah dikeringkan dalam desikator (D<sub>2</sub>). Pengabuan dalam tanur dilakukan pada suhu 550°C selama 5 jam. Timbang setelah didinginkan dalam desikator (I<sub>2</sub>).

Blanko untuk serat yang larut dan tidak larut diperoleh dengan cara seperti prosedur untuk sampel tetapi tanpa sampel (B<sub>1</sub> dan B<sub>2</sub>). Nilai blanko sewaktu-waktu harus dicek bila menggunakan enzim dari batch yang berbeda.

$$\text{Perhitungan : \% IDF} = \frac{D1 - I1 - B1}{W} \times 100\%$$

$$\% \text{ SDF} = \frac{D2 - I2 - B2}{W} \times 100\%$$

$$\% \text{ TDF} = \% \text{ SDF} + \% \text{ IDF}$$

keterangan : W = berat sampel (gram)

D = berat setelah pengeringan (gram)

I = berat setelah pengabuan (gram)

B = berat blanko bebas abu (gram)

### 3.3.5 Pengujian Efek Serat Pangan Semanggi

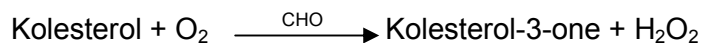
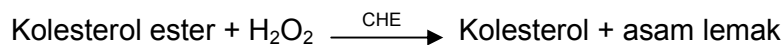
Tahap ini merupakan penelitian utama, dimana hewan uji yang telah diberi diet ateriogenik selama 30 hari, selanjutnya diberi perlakuan :

- ❖ A : Hewan Uji Normal (Kontrol negatif)
- ❖ B : Hewan Uji diet lemak tinggi + ransum semanggi 0 gr (Kontrol positif)
- ❖ C : Hewan Uji diet lemak tinggi + ransum semanggi 5,48 gr/bb

Pemberian ransum dilakukan 1 hari sekali dan dilakukan penimbangan berat badan tikus serta berat sisa ransum untuk mengetahui seberapa bagus ransum yang dibuat.

#### a. Kadar kolesterol Total dalam darah

Berdasarkan metode yang digunakan Rifal (1999) yaitu *Enzymatic Colorimetric Test* CHOD-PAP menggunakan kolesterol kit dengan merek dagang *Diasys produksi Diasys Diagnostic Systems GmbH & Co. KG* Jerman. Prinsip dari metode ini adalah dengan menentukan kolesterol setelah dihidrolisis enzimatis dan dioksidasi. Sebagai indikatornya adalah dengan terbentuknya aguinoneimine dari reaksi 4-aminoantipirin dan fenol oleh hidrogen peroksida di bawah pengaruh katalis peroksidase. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



Reagen pereaksi yang digunakan meliputi GOD'S buffer pH 6.7, Fenol, 4-aminoantipirin. Kolesterol esterase (CHE), Kolesterol oksidase (CHO), dan peroksidase (POD). Larutan sampel dan larutan standar dibuat dengan cara mencampurkan 10 µl serum darah dengan 1000 µl larutan pereaksi sedangkan larutan blanko (B) digunakan 1000 µl dan diinkubasi pada suhu (20-25) °C selama 20 menit atau 10 menit pada suhu 37 °C. Absorbansinya diukur pada spektrofotometer panjang gelombang 500 nm dengan larutan blanko sebagai titik nolnya. Kadar kolesterol total dapat dihitung dengan rumus (dengan kalibrasi standar) sebagai berikut:

$$\frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ standar/Kal}} \times \text{Kons. Standar/Kal (mg/dl)}$$

Δ A : Absorbansi

Standar : 200 mg/dl (5.20 mmol/l)

Faktor kalibrasi : Kolesterol (mg/dl) x 0.02586 = Kolesterol (mmol/l)

#### **b. Kadar HDL dalam darah**

Berdasarkan metode yang digunakan Rifal (1999) yaitu "Presipitasi dari LDL, VLDL dan kilomikron menggunakan *HDL Precipitant kit* dengan merek dagang *Diasys produksi Dyasy Diagnostic Systems GmbH and Co. KG* Jerman. Prinsip dari metode ini yaitu pengendapan kilomikron, VLDL dan LDL dengan cara menambahkan asam fosfotungstik dan ion magnesium pada sampel. Selanjutnya disentrifuse sehingga hanya tertinggal HDL sebagai supernatan. Jumlah kolesterolnya bisa ditentukan secara enzimatik.

Dalam prosedur analisis kadar HDL dalam darah ialah menggunakan reagen magnesium klorida sebanyak 25 mmol/l dan asam fosfotungstik sebanyak 0,55 mmol/l. Adapun prosedur yang dilakukan ada 2, yaitu presipitasi dan penentuan kolesterol. Pada tahap presipitasi, dibuat larutan makro dan semi makro. Larutan makro dibuat dengan cara mencampurkan 500 µl serum darah dengan 1000 µl reagen HDL *undiluted* dan larutan semi makro dibuat dengan cara mencampurkan 200 µl serum darah dan 500 µl reagen HDL *diluted*. Selanjutnya larutan makro dan semi makro tersebut dicampur sampai merata dan disentrifuse selama 2 menit pada 1000 G atau 10 menit pada 4000 G, kemudian dipisahkan supernatan dari endapan yang ada dan ditentukan konsentrasi kolesterolnya.

Pada tahap selanjutnya (penentuan kolesterol), dibuat larutan blanko dan larutan sampel. Larutan blanko dibuat dengan mencampurkan 100 µl air dan 1000 µl reagen pereaksi dan larutan sampel dibuat dengan cara mencampurkan 100 µl supernatan dengan 1000 µl reagen pereaksi. Kemudian dicampur sampai merata dan diinkubasi pada suhu (20-25)<sup>0</sup>C selama 10 menit atau 5 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C. Absorbansinya diukur pada spektrofotometer panjang gelombang 500 nm dengan larutan blanko sebagai titik nolnya. Kadar HDL dapat dihitung dengan rumus (kalibrasi standar) sebagai berikut :

$$\text{Kadar HDL} = \frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ standar/Kal}} \times \text{Kons. Standar/Kal (mg/dl)}$$

$\Delta A$  : Absorbansi

Standar : 200 mg/dl (5.20 mmol/l)

### c. Kadar LDL dalam darah

Berdasarkan metode yang digunakan oleh Rifal (1999) yaitu *formula Friedewald* yang dipercaya bahwa hanya kilomikron yang tidak ada pada sampel dan konsentrasi trigliserida sebesar 400 mg/dl dan sampel menunjukkan tidak ada tanda dari hiperlipoproteinemia tipe 3. Adapun LDL kolesterol dapat dihitung dengan rumus :

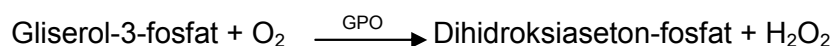
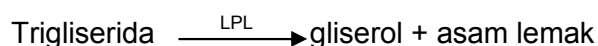
$$\text{LDL kolesterol (mg/dl)} = \text{total kolesterol} - \frac{\text{trigliserida}}{5} - \text{HDL kolesterol}$$

$$\text{LDL kolesterol (mmol/l)} = \text{total kolesterol} - \frac{\text{trigliserida}}{2,2} - \text{HDL kolesterol}$$

### d. Kadar Trigliserida

Prinsip analisis trigliserida darah ini adalah dengan mencampurkan serum dengan larutan pereaksi dan diinkubasi pada suhu 20-25°C selama 20 menit atau suhu 37°C selama 10 menit dan diabsorbansi dengan trigliserida kit panjang gelombang 500 nm.

Berdasarkan metode yang digunakan oleh Rifal (1999) yaitu *Enzymatic Colorimetric Test* gliserol-3-fosfat-oksidase (GPO) menggunakan *Triglycerides kit* merek dagang *Diasys produksi Diasys Diagnostic System GmbH & Co. KG* Jerman. Prinsip dari metode ini adalah menentukan trigliserida setelah dipisahkan secara enzimatis dengan lipoprotein lipase. Indikatornya adalah dengan adanya quinoneimine yang dihasilkan dari 4-aminoantipirine dan 4-klorofenol oleh hidrogen peroksida dibawah pengaruh katalitik di bawah peroksida dihidrolisis secara enzimatis oleh enzim lipase khusus menjadi gliserol dan asam lemak. Gliserol kemudian bereaksi lebih lanjut menurut skema berikut:



Sampel yang digunakan adalah serum. Kestabilan trigliserida dapat disimpan pada suhu (2-8)°C selama 3 hari. Reagen yang digunakan meliputi Good's buffer pH 7.2, 4-klorofenol,

ATP, Mg<sup>+</sup>, Gliserokinase (GK), Peroksidase (POD), Lipoprotein lipase (LPL) 4-Aminoantipirine, Gliserol-3-fosfat-oksidadase (GPO). Larutan sampel dan larutan standar dibuat dengan cara mencampurkan 10 µl serum dengan 1000 µl larutan pereaksi dan diinkubasi pada suhu (20-25) °C selama 20 menit atau 10 menit pada suhu 37 °C. Absorbansi sampel (As) dan standar (Ast) diukur dengan spektrofotometer panjang gelombang 500 nm.

Konsentrasi trigliserida dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi trigliserida} = \frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ standar/Kal}} \times \text{Kons. Standar mg/dl}$$

Δ A : Absorbansi

Standar : 200 mg/dl (2.3 mmol/l)

Faktor konversi : Trigliserida (mg/dl) x 0.01126 = Trigliserida (mmol/l)

#### **e. Kadar kolesterol dalam feses**

Metode yang digunakan dalam penentuan kadar kolesterol dalam feses adalah metode Libermann-Burchard. Prinsip dari metode ini adalah dengan menentukan kadar kolesterol setelah diekstraksi. Kemudian kolesterol bereaksi dengan campuran asetat anhidrat dan asam sulfat sehingga memberikan perubahan warna dari merah menjadi hijau kebiruan (Tarigan, 1983). Adapun prosedur analisis kolesterol dalam feses menurut Tranggono (1992), adalah sebagai berikut:

- Timbang 1 g feses atau digesta. Tambahkan 10 ml aseto-alkohol (1:1)
- Panaskan dalam air mendidih sambil digoyang, sampai mendidih.
- Dinginkan pada suhu kamar
- Larutan disaring, dan filtratnya disentrifuge pada 2500 rpm, selama 15 menit
- Diuapkan dalam water bath pada suhu 100°C sampai kering, kemudian dinginkan
- Larutkan dalam 3 ml asetat anhidrat-asam sulfat (30:1), homogenkan
- Tempatkan diruang gelap selama 5 menit, sehingga larutan berwarna hijau kebiruan. Buat pula larutan blanko. Terabsorbansi pada λ 680 nm.

#### **f. Jumlah Berat Badan dan Berat Organ Hepar tikus**

Prinsip pemberian ransum pakan adalah berdasarkan prosentase berat badan tikus. Menurut Wasito (1992), konsumsi pakan untuk tikus adalah 5% dari berat badan tikus. Ransum pakan diberikan pada tikus secara *ad libitum* (bebas makan).

Untuk berat badan tikus dan berat organ hepar dapat diketahui dengan menimbang tikus dan hepar tikus dengan menggunakan timbangan. Menimbang tikus, prinsipnya adalah tikus dipegang pada bagian dada, telunjuk dan ibu jari diletakkan dibawah rahang, masukkan ke dalam timbangan dan catat beratnya (Astuti, 1986).

#### **g. Pembuatan Preparat dan Pengambilan Gambar Histopatologi**

Prosedur pembuatan preparat dan pengambilan histopatologi (Yusuf A. A., 2009) ialah sebagai berikut :

- a. Membedah tikus dengan menggunakan scalpel.
- b. Kemudian mengambil organ dari tikus
- c. Fiksasi
  - Membersihkan botol kaca kecil untuk wadah sampel dengan menggunakan pembersih botol dan aquades.
  - Meletakkan preparat (organ) yang telah dipotong tipis/ kecil, ke dalam botol kaca kecil.
  - Masukkan larutan Bouins dengan menggunakan pipet tetes untuk mengfiksasi jaringan ke dalam botol kaca yang sudah berisi preparat.
  - Merendam preparat selama 24 jam.
  - Washing fiksasi dengan merendam preparat selama 2 x 15 menit dengan menggunakan alkohol 70%, untuk hasil maksimal botol sampel digoyangkan.
- d. Dehidrasi
  - Mengeluarkan alkohol 70% dengan pipet tetes yang berbeda untuk tiap larutan pada proses washing.
  - Masukkan larutan alkohol 70% ke dalam botol kaca menggunakan pipet tetes hingga sampel terendam.

- Setelah 15 menit pertama keluarkan alkohol 70% dan mengganti dengan alkohol 70% yang kedua, kemudian sampel kembali direndam selama 15 menit.
- Mengganti alkohol 70% dengan memasukkan larutan alkohol 80% selama 2 x 15 menit dengan menggunakan pipet tetes yang baru.
- Mengganti alkohol 80% dengan memasukkan larutan alkohol 96%, selama 2 x 15 menit dengan menggunakan pipet yang baru.

#### e. Clearing

- Mengeluarkan alkohol 96% dari botol sampel, yang dipakai pada proses dehidrasi dengan pipet tetes.
- Memasukkan larutan xylene ke dalam botol sampel sehingga sampel terendam selama 2 x 15 menit.

#### f. Impregnasi

- Mengeluarkan sampel yang telah direndam di dalam larutan xylene, dan memasukkan sampel ke dalam cassette dan dekker.
- Sampel dipindahkan dalam moldtray secara bergiliran ke dalam 3 wadah yang terdapat dalam moldtray.
- Memasukkan sampel ke dalam wadah I yang mengandung xylene dan paraffin murni dengan perbandingan 1 : 1 selama 30 menit,
- Setelah 30 menit preparat di pindahkan lagi ke dalam wadah II yang mengandung paraffin cair selama 30 menit,
- Selanjutnya dimasukkan lagi ke dalam wadah III yang berisi paraffin cair.

#### g. Embedding

- Sampel yang sudah diimpregnasi diletakkan secukupnya dalam lempengan blok (dibagian worksurf dari Histoembedder) dengan posisi yang sudah diatur sedemikian rupa.
- Kemudian lempengan blok ini diisi dengan paraffin cair dan ditutup dengan cassette & deckel dan diberi tanda.
- Kemudian didinginkan di cold plate selama 5 -10 menit atau sampai paraffin mengeras.

#### h. Cutting

- Proses pemotongan ini dilakukan dengan menggunakan mikrotom berfungsi sebagai alat pemotong jaringan, sampel dipotong dengan ketebalan 5-7 mikrometer.
- Kemudian potongan sampel ini diletakkan di objek glass. Dan ditetesi aquades. Lalu diletakkan di penangas air selama  $\pm$  24 jam.

#### i. Staining

- Memasukkan preparat ke dalam xylene selama 2 x 15 menit
- Kemudian direhidrasi dengan alkohol berkonsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah yaitu alkohol 96%, alkohol 80% dan alkohol 70% masing-masing selama 10 menit.
- Kemudian jaringan direndam dalam aquades selama 10 menit.
- Setelah itu memasukkan jaringan ke dalam pewarna Haematoksilin selama 20 menit.
- Kemudian memasukkan jaringan ke dalam eosin selama 1 menit .
- Lalu di dehidrasi dari alkohol konsentrasi rendah ke tinggi 70%, 80%, dan 96% masing-masing selama 10 menit.
- Proses terakhir yakni jaringan ini dicelupkan ke dalam xylene dan ditiriskan.

#### j. Mounting

- Proses mounting yaitu memberikan entelan di atas object glass kemudian merekatkannya dengan deg glass. Entelan ini berfungsi sebagai perekat.

#### k. Pengamatan Objek glass

- Diberi entelan dan ditutup dengan deglass.
- Kemudian mengamati jaringan organ tikus di bawah mikroskop.

#### h. Pemeriksaan F2-Isoprostan secara Immunohistokimia (Koss, 1992)

- Preparat
- Pengecatan Immunohistokimia (pengecatan system ABC = *Avidin Biotin Complex*).
- Blok endogenous peroksidase 3% selama 10 menit
- Bloking normal serum selama 30 menit (1% NGS)
- Inkubasi dengan primer antibodi poliklonal antibodi F2-Isoprostan

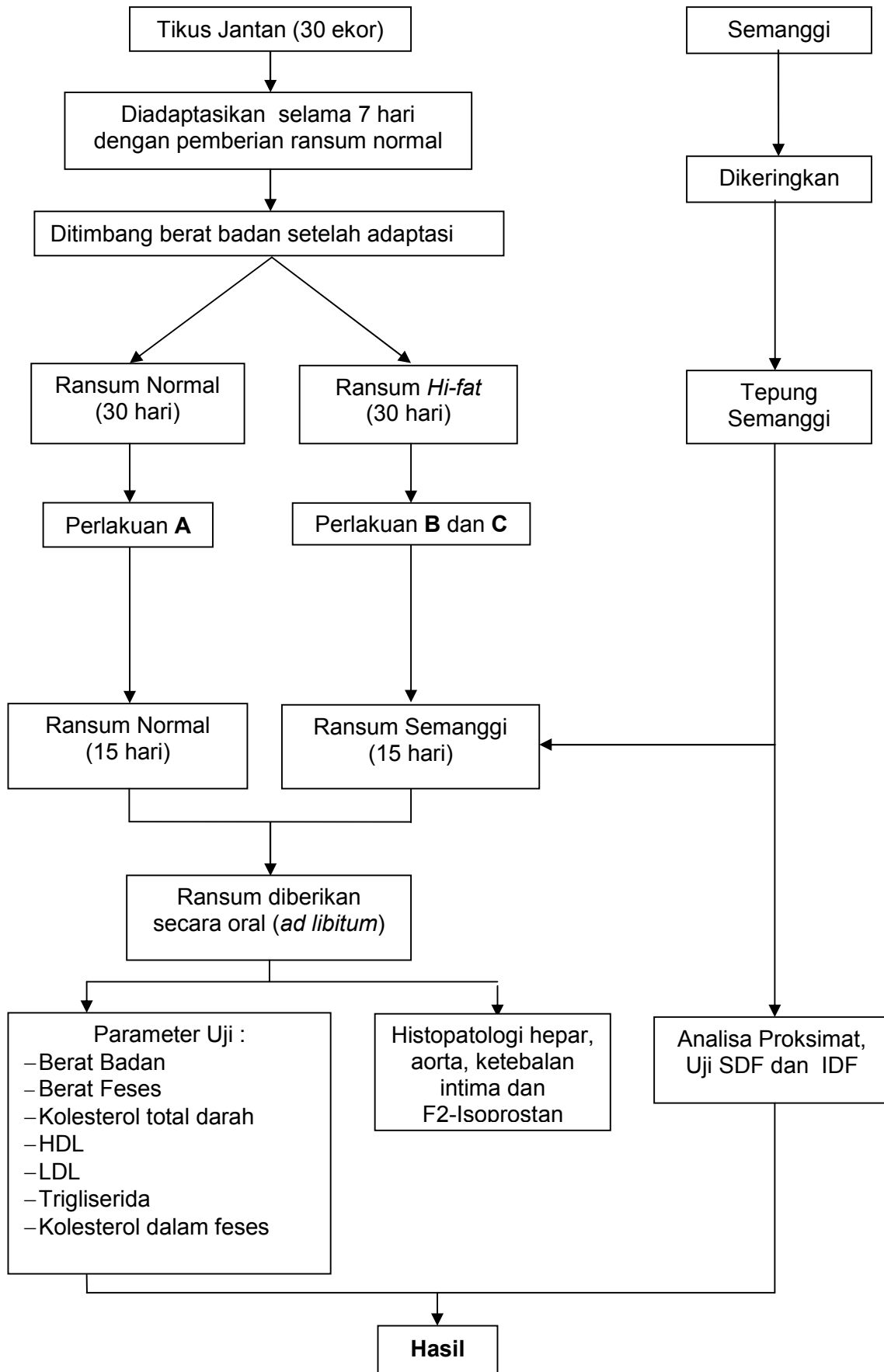


- Inkubasi dengan Biotin Conjugated antibodi sekunder terhadap F2-Isoprostan selama 1 jam
- Inkubasi dengan reagen enzim Avidin Biotin selama 30 detik
- Substrat Kromogen DAB
- Counter staining dengan hematoxylin 5-10 detik
- Tutup dengan coverglass
- Hasil : Dilihat dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 40X10 terlihat sel yang mengandung F2-Isoprostan berwarna coklat.

**i. Pengukuran Ketebalan Intima**

- Preparat di lihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 100x10 kemudian di ukur ketebalannya.

### 3.4 Skema Kerja Penelitian



### **3.5 Analisa Parameter Uji**

Parameter uji yang dilakukan untuk mengetahui tingkat pengaruh pemberian semanggi pada profil serum dan histopatologi aorta dan hepar tikus. Maka dilakukan pengukuran terhadap jumlah berat badan, berat organ hepar tikus, kolesterol total darah, HDL, LDL, trigliserida, kolesterol dalam feses, histopatologi terhadap hepar dan aorta, mengukur ketebalan intima aorta serta imunohistokimia F2-Isoprostan terhadap aorta tikus.

### **3.6 Analisa Data**

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan tara 5%, yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur.