

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Dalam penelitian skripsi yang berjudul Pengaruh Terapi *Yogurt* Susu Kambing Terhadap Kadar *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT), *Serum Glutamic Piruvic Transaminase* (SGPT) dan Profil Protein Serum Model Tikus (*Rattus norvegicus*) Hiperkolesterolemia dilakukan pada bulan Agustus 2013 – Juni 2014. Tempat penelitian berada di Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Laboratorium Kesehatan masyarakat Veteriner, Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya, Malang dan Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya. Laboratorium FAAL, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Biokimia, Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam dan Matematika, Universitas Brawijaya. Malang.

### 4.2 Alat dan Bahan

#### 4.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : *freezedryer* (Christ Beta 1-8 K), sentrifuse (Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge, Sorvall Legend Micro 17), *refrigerator*, kompor gas, inkubator (Mettmert Ine500), autoclave, gelas kimia, pengaduk kaca, timbangan digital (Precisa 300D), termometer raksa, pH meter (Eutech Instrument Cyberscan pH 310), pH indikator, *cooler box*, corong kaca, botol pereaksi/botol penampungan 1000 mL, erlenmeyer 250 mL dan

100 mL, gelas ukur 50 mL, pipet ukur 5 mL, karet bulb, sarung tangan, masker, tabung mikro (*ependorf*), gelas objek, *slide*, *cover slide*, *mortar*, *vortex*, *micropipette* ukuran 10-100  $\mu\text{L}$ , *micropipette* ukuran 1000  $\mu\text{L}$ , *micropipette* ukuran 2-25  $\mu\text{L}$  *microtipe* warna kuning, *microtipe* warna biru, *microtipe* warna putih, kandang tikus berupa bak plastik dan tutup kandang dari kawat, botol minum tikus, sekam berupa parutan kayu halus sebagai alas kandang, tempat makan tikus, spuit 3 mL dan alat sonde, *animal restrain*, seperangkat alat bedah berupa scalpel dan blade, gunting penjepit, pinset, cawan petri, seperangkat alat gelas, penangas air, neraca analitik (Sartorius Basic tipe p-160 kepekaan 0,0001-160g), alat sentrifugasi (Denley tipe BR 401). Sonikator (Branson 200), *vortex* (Guo-Huq), seperangkat alat elektroforesis *mini protean tetra cell* (Bio-rad) dan shaker, dan spektrofotometer *BioSystem*.

#### 4.2.2 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jenis kelamin jantan berumur 10-12 minggu, berat badan 150-200 gram diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta, susu kambing (PE) segar diperoleh dari Balai Besar Pelatihan Peternakan (BBPP) kota Batu, minyak babi, asam kholat (Catalog No: M5M5306), Kuning telur puyuh, starter *yogurtmet*, aquadess, spirtus, UGB, T-Akri, APS, TEMED, PBST-PMSF, Glicin, SDS, TrisBase, Tris 121 mmol/L, L-aspartate 363 mmol/L, malate dehydrogenase > 460 U/L dan lactat dehydrogenase > 660 U/L pH 7,8, Tris 150 mmol/L, L-alanin 750 mmol/L, dan lactat dehydrogenase > 1350U/L, pH 7,3.

### 4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan sebagai berikut :

1. Kerangka penelitian dan preparasi hewan coba tikus.
2. Penentuan dosis terapi *yogurt* susu kambing.
3. Pembuatan *yogurt* susu kambing.
4. Pembuatan pakan diet hiperkoleterol.
5. Preparasi tikus hiperkoleterolemia.
6. Pemberian terapi *yogurt* susu kambing.
7. Analisis kadar kolesterol melalui serum darah.
8. Analisis kadar SGOT-SGPT dan profil protein serum dengan metode SDS-PAGE.

### 4.4 Prosedur Kerja

#### 4.4.1 Kerangka Penelitian dan Preparasi Hewan Model Tikus

Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental, rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan pengukuran kadar kolesterol dilakukan *pre* dan *post examination*. Hewan coba dibagi menjadi lima perlakuan yaitu kelompok kontrol positif, negatif, terapi dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari empat ekor tikus sebagai ulangan sehingga total tikus sebanyak 20 ekor. Kelompok hewan percobaan tikus dibedakan kontrol negatif dan kontrol positif. Rancangan penelitian ditunjukkan dalam Tabel 4.1. Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Dosis *yogurt* susu kambing 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, 900 mg/kg BB dan dosis diet hiperkolesterol.

Variabel terikat : Kadar *Serum Glutamate Pyruvat Transaminase* (SGPT) *Serum Glutamate Oxaloacetate Transaminase* (SGOT) dan profil pita protein serum dengan metode SDS-PAGE.

Variabel kontrol : Umur, jenis kelamin, berat badan, tikus (*Rattus norvegicus*) dan diet hiperkolesterol.

**Tabel 4.1** Rancangan Perlakuan Percobaan

Kelompok Tikus	Perlakuan
A	Tikus kontrol yaitu tikus tanpa perlakuan
B	Tikus hiperkolesterolemia
C	Tikus hiperkolesterolemia dan diterapi <i>yogurt</i> susu kambing dosis 300 mg/kg BB
D	Tikus hiperkolesterolemia dan diterapi <i>yogurt</i> susu kambing dosis 600 mg/kg BB
E	Tikus hiperkolesterolemia dan diterapi <i>yogurt</i> susu kambing dosis 900 mg/kg BB

Sampel penelitian menggunakan hewan coba tikus dengan spesies (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar berumur 10-12 minggu. Berat badan tikus sekitar 150-200 gram. Hewan coba mendapatkan perlakuan aklimatisasi tujuh hari dilaboratorium guna adaptasi di laboratorium. Estimasi sampel yang dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t : jumlah kelompok

n : jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan didapatkan besar sampel untuk setiap perlakuan berjumlah lima macam diperlukan untuk sampel atau ulangan paling sedikit empat kali dalam kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba, mengantisipasi adanya tikus mati saat masa adaptasi dan perlakuan ditambahkan 5 ekor hewan coba.

Preparasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberikan pakan standar dalam bentuk pelet yang mengandung bahan kering 88,71%, abu 7,14%, protein kasar 20,84%, serat kasar 9,05% dan lemak kasar 4,45% dan air minum secara *ad libitum*. Selanjutnya dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor. (*Rattus norvegicus*) dikandangkan dalam kandang berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm. Kandang terbuat dari plastik yang memiliki penutup yang terbuat dari anyaman kawat, berlokasi pada tempat yang bebas dari suara dan terjaga dalam lingkungan yang bebas dari polutan.

#### 4.4.2 Penentuan Dosis Terapi

Dosis terapi *yogurt* susu kambing yang diberikan pada penelitian ini memiliki 3 macam yaitu 300mg/kg BB, 600mg/kg BB, 900mg/kg BB dengan pemberian kepada hewan coba (*Rattus norvegicus*) selama 4 minggu atau 28 hari. Pemberian *yogurt* dilakukan secara sonde lambung. Perhitungan dosis terapi dapat dilihat pada (Lampiran 3).

#### 4.4.3 Pembuatan *Yogurt* Susu Kambing

##### 4.4.3.1. Starter

Susu kambing dituangkan kedalam tabung erlenmeyer sebanyak 50 mL kemudian ditutup dengan aluminium foil lalu dimasukkan ke wadah panci yang sudah berisi air panas bersuhu 72°C selama 5 menit, pengaturan suhu diperhatikan dengan mengatur besar kecil penggunaan api kompor dan tetap menggunakan termometer raksa untuk pengecekan suhu. Setelah mencapai 5 menit tabung dikeluarkan dan direndam pada panci yang berisi air dingin tunggu hingga suhu menjadi 45°C. Penurunan suhu dari 72°C-45°C kurang lebih membutuhkan waktu 3 menit. Setelah susu dingin disiapkan inokulasi starter menggunakan starter *yogourmet*, sebelum melakukan inokulasi dilakukan sterilisasi laboratorium untuk mengurangi kontaminasi mikroba lain masuk dalam susu, dengan cara penyemprotan dengan alkohol 70% agar aseptis.

Pada petunjuk penggunaan starter yang tertera pada label *yogourmet* adalah 5 gram *yogourmet* digunakan untuk 1 liter susu, sedangkan yang digunakan adalah 50 mL susu maka *yogourmet* yang dibutuhkan adalah 0,25 gram. Starter yang

sudah ditimbang dimasukkan kedalam gelas ukur, lalu masukkan susu kambing yang telah dipasteurisasi secara perlahan sampai terlarut. Setelah tercampur lalu dimasukkan kedalam susu kambing didalam botol pereaksi/botol penampungan seluruhnya. Pencampuran ini dilakukan dengan steril dan goyang sedikit demi sedikit jangan sampai berbuih dan merata. Kemudian dilakukan inkubasi selama 4 jam pada suhu 45°C setelah 4 jam akan menjadi starter *yogurt*, lalu dikeluarkan dari inkubator dan menunggu hingga suhu ruangan. Setelah starter *yogurt* pada suhu ruangan dilakukan pengecekan pH dengan cara pengambilan sampel 1 mL lalu diukur dengan pH meter dan pH indikator.

#### 4.4.3.2 Pembuatan *Yogurt*

Pembuatan *yogurt* dilakukan untuk memenuhi kebutuhan dosis terapi dengan membuat *yogurt* susu kambing dengan membutuhkan sebanyak 1500 mL. Langkah pertama dilakukan proses pasteurisasi, kemudian tahapan inokulasi starter dengan proses yang aseptis. Pengambilan starter sebanyak 15mL dengan pipet ukur berukuran 5 mL dimasukkan pada botol pereaksi/botol penampungan yang berisi 500 mL susu kambing dan dilanjutkan dengan 12 mL starter untuk botol pereaksi/botol penampungan yang berisi 400 mL susu kambing lalu goyang perlahan hingga merata dan hindari timbulnya buih. Setelah itu botol pereaksi/botol penampungan diinkubasi pada suhu 45°C selama 4 jam. Setelah 4 jam botol pereaksi/botol penampungan yang berisi susu tersebut diambil dari inkubator dan diletakkan pada suhu ruang selama 4-5 menit agar kondisi bakteri asam laktat (BAL) dalam *yogurt* tersebut stabil dahulu. Kemudian dilakukan pengujian pH dengan pH indikator dan pH meter.

*Yogurt* yang siap selanjutnya diaduk atau digoyangkan secara merata dan perlahan, kemudian diukur pH nya dengan menggunakan pH-meter. Selama proses fermentasi susu terjadi perubahan pH (Yusmarini dan Raswen, 2004). Susu difermentasi dengan menggunakan bakteri *Lactobacillus Achidophilus*, *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* dapat mengalami penurunan pH yakni berkisar antara 3,7 – 4,5 (Nitema, 2006).

#### **4.4.3.3 Pembuatan Freeze Dried Yogurt Susu Kambing**

Pada penelitian ini untuk memudahkan perlakuan terapi pada hewan coba, *yogurt* susu kambing yang telah terbentuk diubah menjadi bentuk serbuk. Pengubahan *yogurt* susu kambing dari cair menjadi serbuk dengan mesin *freesdry* (Christ LMC-2 atau Christ beta 1-8K). *Yogurt* susu kambing sebanyak 500 mL dibekukan dengan cairan etanol pada suhu – 33°C selama 5-7 menit. *Yogurt* susu kambing yang beku disublimasi dengan uap panas selama 14 jam hingga terbentuk serbuk *yogurt* susu kambing (Christ, 2010).

#### **4.4.4 Preparasi Tikus Hiperkolesterolemia dengan Diet Hiperkolesterol**

Pakan diet hiperkolesterol terdiri dari asam kholat 0,1%, minyak babi 10%, dan kuning telur puyuh rebus segar 5% (Gani, *et al.*, 2013 ). Semua bahan dicampur lalu diencerkan dengan akuades sampai volume 1,5 mL. Pakan diet hiperkolesterol diberikan setiap hari selama 14 hari dengan metode *force feeding* dengan sonde per tikus sebesar 3,02g/1,5 mL. Setelah itu, tikus diberi minum dan pakan standar tikus berupa pelet 16,98 gram. Pakan yang diberikan sebanyak 20 g/ekor/hari. Komposisi bahan pakan hiperkolesterol dalam 20 gram pakan terdiri

atas asam kholat memiliki kandungan 0,1% dengan jumlah pemberian 0,02 gram, minyak babi 10% sebanyak 2 gram, dan kuning telur puyuh rebus segar 5% sebanyak 1 gram.

#### 4.4.5 Pemberian Terapi *Yogurt* Susu Kambing

Terapi *yogurt* susu kambing diberikan setelah tikus diinduksi hiperkolesterolemia selama 14 hari. Kelompok tikus yang diberikan terapi yaitu kelompok C, D, dan E dengan dosis berturut-turut sebesar 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB. Terapi diberikan secara per oral dengan sonde lambung sebanyak 1,5 mL selama 4 minggu (28 hari).

#### 4.4.6 Analisis Kadar Kolesterol melalui Serum Darah

Kadar kolesterol total pada serum tikus putih diukur dengan metode enzimatik *Cholesterol Oxidase Phenol Aminoantipyrin* (CHOD-PAP) yang dikembangkan oleh *Roche Diagnostic, Germany* (*Analyticon* 200 mg/dl) dan diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 510 nm.

Tikus terlebih dahulu diletakkan di alat restrain, kemudian pengambilan darah dilakukan melalui vena *coccygeal* sebanyak 2 mL. Kemudian darah tersebut dimasukkan dalam tabung *microtube* dan diletakkan dengan posisi miring 45° agar serum dan darah bisa terpisah dengan sempurna dan dibiarkan mengendap pada suhu kamar selama  $\pm$  3-4 jam untuk mendapatkan serum. Selanjutnya serum tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam tabung eppendrof yang lain dan masih bersih lalu disimpan pada *refrigerator* dengan suhu 4°C. Langkah- langkah dalam pengukuran kolesterol dapat dilihat pada (Lampiran 6).

#### 4.4.7 Pengukuran Kadar SGOT dan SGPT

Pengukuran kadar SGOT terdiri dari reagen I yaitu Tris 121 mmol/L, L-aspartate 363 mmol/L, malate dehydrogenase > 460 U/L dan lactat dehydrogenase > 660 U/L pH 7,8 dan reagen II 2-oksaloglutarat, NADH. Prinsip kerjanya SGOT mengkatalisis, transfer gugus amino dari aspartat menjadi 2-oksaglutarat membentuk oxalate dan glutamate. Konsentrasi ditentukan dari penurunan NADH, diukur pada panjang gelombang 340 nm melalui reaksi dehidrogenase.

Langkah pengukuran kadar SGOT mempersiapkan kit SGOT kuvet I sebagai blanko diberi 100 mL akuades dan 1000 mL reagen I, setelah dicampur dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C, masing-masing kuvet dicampur dan ditambah 250 mL reagen II. Setelah tercampur dan diinkubasi 1 menit pada suhu yang sama, ditentukan *optical density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Pembacaan OD diulang 3 kali dengan interval waktu 1 menit. Delta absorben/menit selanjutnya dikalikan factor konversi sebesar 3971 untuk mendapatkan kadar SGOT.

Pada kadar SGPT komposisi reagen I terdiri dari Tris 150 mmol/L, L-alanin 750 mmol/L, dan lactat dehydrogenase > 1350U/L, pH 7,3 dan reagen II terdiri dari 2-oksaloglutarat, NADH. Prinsip kerjanya mengkatalisis yang ditransfer dari kelompok amino berasal dari alanin-2-oxoglutarate, bentuk piruvat dan glutamate, konsentrasi katalis ditentukan dari peningkatan NADH, pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 340 nm.

Pengukuran kadar SGPT mempersiapkan kit SGPT kuvet I sebagai blanko diberi 100 mL akuades dan 1000 mL reagen I, setelah dicampur dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C, masing-masing kuvet dicampur dan ditambah 250 mL reagen II. Setelah tercampur dan diinkubasi 1 menit pada suhu yang sama, ditentukan *optical density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Pembacaan OD diulang 3 kali dengan interval waktu 1 menit. Delta absorben/menit selanjutnya dikalikan factor konversi sebesar 3971 untuk mendapatkan kadar SGPT.

#### **4.4.8 Isolasi Protein Serum**

Serum diambil sebanyak 200  $\mu$ L lalu ditambah larutan PBS-Tween : PMSF (1:1) sebanyak 5 kali volume sampel. Setelah itu disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan diputar dengan alat sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Selanjutnya supernatan diambil dan ditambah etanol absolut dingin (1:1) dan dibiarkan selama 12-24 jam hingga terbentuk endapan. Setelah itu diputar selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm, lalu diambil endapannya dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah larutan Tris-HCL (0,02mL,pH 6,8) dingin dengan perbandingan volume 1:1 lalu dilakukan homogenasi. Setelah itu disimpan pada suhu -20°C.

#### **4.4.9 Penentuan Profil Protein dengan Metode SDS-PAGE**

##### **4.4.9.1 Persiapan Gel**

Plat gel dibuat dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat 1mm. Gel dibuat dua lapis yaitu sel sebagai tempat sampel dan gel sebagai media untuk

pemisahan protein. Gel pemisah dibuat dengan mencampurkan *Lower Gel Buffer* (LGB), T-Acryl, akuades steril, *ammonium persulphate* (APS) dan *N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine* (TEMED). Lalu tuang larutan tersebut dalam plat menggunakan pipet (dilakukan dengan cepat). Kemudian dituang akuades steril diatas gel secara perlahan supaya permukaan gel tidak bergelembung. Lalu gel dibiarkan selama 10-30 menit sampai memadat. Setelah itu air yang berada di atas gel pemisah dibuang. Selanjutnya dibuat gel pengumpul sampel (*stacking gel*) dengan cara mencampurkan *Upper Gel Buffer* (UGB), T-Acryl, akuades steril, APS dan TEMED. Kemudian gel pengumpul dituang diatas gel pemisah dengan pipet lalu dipasang sisiran pembatas sampel gel memadat dan terbentuk sumuran, kemudian sisiran dilepas lalu plat dipasang pada wadah alat elektroforesis. Selanjutnya larutan *running buffer* dituang pada wadah alat tersebut.

#### 4.4.9.2 Injeksi Sampel dan *Running*

Protein serum diambil 1  $\mu\text{L}$  ditambah 19  $\mu\text{L}$  tris-HCL dan ditambah 20  $\mu\text{L}$  *Reducing Sampel Buffer* (RSB). Lalu dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 10 menit. Kemudian didinginkan, setelah itu sampel siap dimasukkan dalam sumuran gel dengan volume 30  $\mu\text{L}$  untuk tiap sumur (untuk protein standar sebagai penanda diperlakukan sama dengan sampel). Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru penanda berada sekitar 0,5 cm dari batas bawah plat gel.

#### 4.4.9.3 Perwanaaan Gel

Gel hasil *running* direndam dalam larutan pewarna *Coomasie Brilliant Blue* (CBB) sambil dikocok menggunakan alat pengocok selama 30 menit. Kemudian direndam dalam larutan penghilang warna sambil dikocok menggunakan alat pengocok sampai pita terlihat jelas pada gel.

#### 4.4.9.4 Penentuan Berat Molekul (BM)

Berat molekul (BM) protein dapat ditentukan dengan mengukur mobilitas ( $R_f$ ) molekul protein dalam gel poliakrilamid (mengandung SDS) berdasarkan kurva standar BM protein standar. BM protein ditentukan dengan membandingkan mobilitasnya terhadap serangkaian protein standar dengan BM yang telah diketahui (*marker*). Pengukuran *Retardation Factor* ( $R_f$ ) mengikuti rumus:

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

Nilai  $R_f$  yang dihitung diplot pada sumbu X dan nilai log BM diplot pada sumbu Y. Grafik yang didapatkan berupa grafik linier dengan persamaan garis  $Y=-ax+b$ . Dari persamaan ini  $R_f$  dan BM protein yang akan dicari diplotkan sehingga diketahui nilai BM protein. Perhitungan dapat dilihat pada (Lampiran 10).

#### 4.5 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan acak lengkap (RAL) dimana tikus dibagi menjadi lima perlakuan dengan empat kali ulangan. Analisis kadar SGOT-SGPT menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Tukey  $\alpha = 0,05$ ,

menggunakan *SPSS 16.0 For Windows* (Lampiran 7). Gambaran profil protein secara semi kuantitatif (Lampiran 10).

