BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa laboratorium yaitu perawatan, perlakuan dan pembedahan terhadap hewan model dilaksanakan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang, pengukuran aktivitas enzim protease hepar dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang serta pembuatan dan pengamatan preparat histopatologi hepar dilaksanakan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan selama bulan Januari 2016 sampai dengan April 2016.

4.2 Bahan Penelitian

4.2.1 Hewan coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus)* jantan yang berusia 8-12 minggu dengan berat badan 180 gram. Pemeliharaan hewan coba dilakukan didalam kandang berupa bak plastik dengan tutup kawat beralas sekam yang ditempatkan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang. Setiap pagi diberi pakan ransum dan minum secara *ad libitum.*

4.2.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.2.1 Alat

Kandang tikus, timbangan untuk menimbang berat badan tikus, tempat pakan dan minum hewan coba, cawan petri, oven, *stirrer*, *spuit,* freezer, sonde, pot untuk fiksasi jaringan, gunting, pinset, jarum pentul, *microtube*, mikroskop cahaya, mortar, alat sentrifugasi, *objek glass*, *cover glass*, tabung reaksi, lemari pendingin,

tabung polipropilen, *autoclave*, vorteks, sonikator, labu ukur, *micropipet*, mortar steril dingin, pipet tetes, tabung propilen steril, penangas air, glove, masker, *blue tip, yellow tip*, pH meter digital, inkubator, lemari pendingin, pisau, dan spektrofotometer.

4.2.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain air alkali, minyak jagung, indometasin, larutan PBS-azida, NaCl fisiologis 0,9%, PFA, xylol, etanol (absolute, 95%, 90%, 80%, 70%), aquades steril, pasir kuarsa, hematoksilin eosin, buffer asetat, PBS-Tween:PMSF, Tris-HCl, larutan tirosin, akuades, kasein 500 ppm, larutan buffer fosfat, TCA dan parafin.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria hewan model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar*, jenis kelamin jantan, umur 8-12 minggu, berat badan antara 150-200 gram, kondisi sehat (berambut cerah, aktivitas baik, tidak ada abnormalitas anatomis, dan nafsu makan baik), lulus proses sertifikasi layak etik penelitian oleh KEP dan belum pernah digunakan penelitian.

4.3.2 Pembagian Kelompok Penelitian

Kelompok penelitian ditunjukkan dalam Tabel 4.1 sebagai berikut :

Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan
KN (Kontrol Negatif)	Tikus dibiarkan hidup normal dengan pakan standart dan air minum pada hari ke-1 dilakukan pembedahan
KP (Kontrol Positif)	Tikus diinduksi dengan indometasin dengan dosis 15 mg/ekor pada hari ke-1 dan dilakukan pembedahan 24 jam setelah induksi indometasin pada hari ke-2
Terapi air alkali 1 ml/kg BB	Pada hari ke-1 tikus diinduksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB, selanjutnya pada hari ke-2 diberi air alkali sebanyak 1 ml/ekor selama 7 hari berturut-turut dan pada hari ke-9 dilakukan pembedahan
Terapi air alkali 2 ml/kg BB	Pada hari ke-1 tikus diinduksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB, selanjutnya pada hari ke-2 diberi air alkali sebanyak 2 ml/ekor selama 7 hari berturut-turut dan pada hari ke-9 dilakukan pembedahan

Sampel penelitian berupa hewan coba tikus wistar (*Rattus novergicus*) jantan yang berusia 8-12 minggu dengan berat badan 180 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari yang ditempatkan di laboratorium Biosains Universitas

Brawijaya Malang. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus rumus p (n-1) ≥ 15 (Kusriningrum, 2008).

Sehingga :

$$p\,(n-1) \geq 15$$
$$4\,(n-1) \geq 15$$
$$4n-4 \geq 15$$
$$4n \geq 19$$
$$n \geq 4{,}75$$
$$n \geq 5$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka diperoleh 4 perlakuan kelompok dengan 5 kali ulangan dalam setiap kelompok. Total tikus yang dibutuhkan adalah 20. Selanjutnya dibagi dalam 4 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1 dan perlakuan 2.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental (*experiment design*) dengan menggunakan metode *Post test only control group design*, yaitu kegiatan percobaan (eksperimen) yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian meliputi :

Variabel bebas : Induksi indometasin dan terapi air alkali

Variabel Tergantung : Histopatologi hepar dan aktivitas protease

Variabel Kontrol : Tikus (Umur, *strain*, jenis kelamin dan pakan) dan kondisi eksperimental.

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Jumlah keseluruhan hewan coba yang digunakan 20 ekor dan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan masing-masing 5 ekor tikus. Sebelum perlakuan, tikus diaklimatisasi di kandang, tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 50 x 40 x 20 cm dengan jumlah sesuai setiap kandang. Kandang terbuat dari plastik dengan tutup dari rangka kawat. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24^{0}C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup selama 7 hari agar tikus beradaptasi dengan lingkungan. Tikus diberi minum ad libitum dan pakan yang sama selama proses perlakuan.

4.6.2 Persiapan Indometasin

Pemberian indometasin menggunakan metode sonde lambung. Dosis indometasin yang digunakan adalah 15 mg/kg BB tikus. Berat rata-rata tikus yang digunakan kurang lebih 180 gram dan terdapat 4 kelompok perlakuan masing-masing 5 ekor tikus yang akan diinduksi indometasin, maka indometasin yang diperlukan untuk setiap tikus adalah :

$$\frac{180\ gr}{1000\ gr} \text{ x } 15 \text{ mg/kgBB} = 2{,}7 \text{ mg/tikus}$$

Untuk membuat larutan stok, setiap 45 mg indometasin akan dilarutkan ke dalam 4 ml pelarut minyak jagung (Bures *et al*., 2011). Banyaknya larutan yang diperlukan untuk pemberian per oral adalah :

$$\frac{2{,}7\ mg}{45\ mg} \text{ x } 4 \text{ ml} = 0{,}24 \text{ ml/tikus}$$

Minyak jagung ini berfungsi sebagai pelarut. Indometasin yang sudah dihitung dosisnya, lalu ditambahkan dengan minyak jagung. Setelah itu di *vortex* yang berfungsi untuk melarutkan indometasin selanjutnya dilakukan qinkubasi selama 24 jam.

4.6.3 Persiapan Air Alkali

Air alkali yang diberikan pada tikus menggunakan metode sonde lambung, volume yang digunakan yaitu 1 ml/ekor dan 2 ml/ekor dengan berat rata-rata tikus yang digunakan kurang lebih 180 gram dan terdapat 10 ekor yang akan diberikan terapi air alkali yaitu kelompok terapi 1 ml/ekor dan 2 ml/ekor.

4.6.4 Pengambilan Organ Hepar

Pengambilan organ hepar, dilakukan dengan pembedahan pada bagian perut. Langkah pertama yang dilakukan yakni dilakukan *euthanasi* tikus dengan metode dislokasi leher, kemudian tikus diletakkan di atas papan bedah dengan posisi rebah dorsal sehingga bagian dada menengadah ke atas dan siap dibedah. Pembedahan dilakukan dengan membuat insisi di bagian abdomen dan diisolasi organ bagian hepar. Hepar dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9% dingin, lalu hepar dibagi menjadi dua dimana ¼ bagian dimasukkan dalam larutan PFA 10% untuk pembuatan preparat histopatologi dan ¾ bagian dimasukkan dalam larutan PBS-azida pH 7,4 dan disimpan dalam lemari pendingin sebagai bahan isolasi protease (Pratiwi dkk., 2013).

4.6.5 Isolasi Protease

Organ hepar seberat 0,5 gram dipotong kecil-kecil, lalu ditambah larutan PBS-Tween:PMSF sebanyak 1 ml, ditambah sedikit pasir kuarsa dan digerus

dengan mortar dingin. Setelah itu ditambah dengan larutan PBS-Tween:PMSF sebanyak 2 ml dan dipindahkan kedalam tabung polipropilen yang telah disterilisasi dengan *autoclave.* Kemudian dihomogenkan dengan vorteks selama 10 menit, disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan diputar dengan alat sentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm). Selanjutnya, supernatannya diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifugasi selama 15 menit (10.000 rpm), diambil endapannya dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Kemudian, endapan ditambah dengan larutan 0,02 M Tris-HCl dingin dengan perbandingan volume 1:1 dan dilakukan homogenasi.

4.6.6 Pengukuran Aktivitas Enzim Protease

Pengukuran aktivitas enzim protease yang dilakukan sesuai dengan metode yang digunakan oleh Walter (Damayanti, 2015).

4.6.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

Penentuan panjang gelombang maksimum tirosin dibutuhkan larutan standar tirosin dengan konsentrasi 50 µg/ml sebanyak 1 ml, diukur absorbansinya pada rentang panjang gelombang 240 – 320 nm dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis sehingga didapatkan panjang gelombang maksimum dari absorbansi yang paling tinggi. Penentuan panjang gelombang tirosin ini digunakan untuk membuat kurva baku tirosin dan pengukuran absorbansi sampel.

4.6.6.2 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Labu ukur 10 ml sebanyak 10 buah, kemudian masing-masing diisi dengan larutan baku tirosin sebanyak 1 ml dengan konsentrasi yang berbeda-beda yaitu 10,

20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 µg/ml untuk membuat larutan standar tirosin 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 dan 20 µg/ml. Setelah itu ditambahkan akuades sampai tanda batas, lalu ditutup dan dikocok sampai homogen. Larutan standar tirosin 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 dan 20 µg/ml diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh, kemudian hasil absorbansinya dibuat kurva baku tirosin.

4.6.6.3 Pengukuran Aktivitas Protease Hasil Isolasi Organ Hepar

Larutan kasein 500 ppm sebanyak 200 µl larutan dimasukkan dalam microtube, kemudian ditambahkan 300 µl larutan buffer fosfat pH 7 dan 100 µl isolat enzim protease hasil isolasi hepar. Setelah itu didiamkan selama 60 menit pada suhu 37^{o}C di dalam inkubator, ditambahkan 400 µl larutan TCA 4% dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian disentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit dengan suhu 25 ^{o}C. Supernatannya diambil sebanyak 200 µl, kemudian ditambahkan buffer fosfat 5 kali volume sampel (supernatan). Setelah itu, diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum tirosin yang diperoleh. Larutan blanko yang akan digunakan dibuat dengan prosedur yang sama yakni seperti prosedur penentuan aktivitas protease, tetapi untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim. Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai banyaknya satu mikromol tirosin per menit pada kondisi optimal enzim tersebut pada reaksi enzimatis. Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan berdasarkan rumus :

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{[Tirosin]}{Mr\ tirosin} \text{ x } \frac{v}{pxq} \text{ x fp}$$

Keterangan:

v = volume total sampel (ml) q = waktu inkubasi (menit)

fp = faktor pengenceran p = jumlah enzim (ml)

Mr = Berat molekul (181)

4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi

Evaluasi histopatologi dilakukan dengan pembuatan preparat organ hepar dengan pewarnaan *Hematoksilin Eosin* (HE). Metode yang digunakan adalah metode Junqueira & Carneiro (2007). Persiapan organ hepar yang akan dibuat sebagai sediaan, dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9%, dilakukan fiksasi dengan PFA dan proses *dehidrasi* dengan etanol bertingkat. Sampel terdehidrasi dilanjutkan dengan proses *clearing* dengan xylol I, II, III masing-masing selama 1 jam, dilanjutkan proses infiltrasi pada cairan parafin cair I, II, III dalam oven masing-masing selam 1 jam, *embedding block* pada parafin. Proses selanjutnya yaitu *sectioning* untuk ditempelkan pada *object glass* dan dilakukan pewarnaan *Hematoksilin Eosin* (HE).

Pewarnaan *Hematoksilin Eosin* (HE) diawali dengan deparafinasi dengan xylol selama 5 menit dan dimasukkan kedalam etanol (absolute, 95%, 90%, 80%, 70%) masing-masing selama 5 menit. Dilanjutkan dengan dicuci pada air mengalir selama 15 menit dan direndam dalam aquades steril selama 5 menit. Preparat kemudian diwarnai dengan hematoksilin selama 10 menit, dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas dengan aquades steril selama 5 menit. Selanjutnya preparat diwarnai dengan eosin selama 5 menit, dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan dibilas dengan aquades steril selama 5 menit,

dimasukkan dalam etanol (70%, 80%, 90% dan 95%) masing-masing 10 menit dan etanol absolute selama 3 x 5 menit. Preparat selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan xylol selama 2 x 5 menit, dikeringkan dan ditutup *cover glass.*

4.6.8 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histopatologi organ hepar dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus BX-51) dengan perbesaran 400x. Pengamatan histopatologi organ hepar meliputi sel hepatosit dan sinusoid hepar.

4.7 Analisa Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini yaitu gambaran histopatologi organ hepar dan aktivitas protease. Analisa data yang digunakan berupa gambaran histopatologi hepar yang dianalisis dan disajikan secara deskriptif dan data kuantitatif untuk mengetahui aktivitas enzim protease akan dianalisis dan disajikan dengan Uji ANOVA dan uji lanjutan BNJ dengan $\alpha = 0{,}05$ untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.