

**STUDI AKTIVITAS MALTASE HASIL ISOLASI DARI JEJUNUM  
TIKUS PUTIH(*Rattus norvegicus*) MALNUTRISI YANG  
MENDAPAT TERAPI GLUTAMIN**

**SKRIPSI**

Oleh :

**NURLEILA MAHARANI**

0510920047-92



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

**STUDI AKTIVITAS MALTASE HASIL ISOLASI DARI JEJUNUM  
TIKUS PUTIH(*Rattus norvegicus*) MALNUTRISI YANG  
MENDAPAT TERAPI GLUTAMIN**

**SKRIPSI**

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

Oleh :

**NURLEILA MAHARANI**

0510920047-92



**JURUSAN KIMIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2009**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**  
**STUDI AKTIVITAS MALTASE HASIL ISOLASI DARI**  
**JEJUNUM TIKUS PUTIH(*Rattus norvegicus*) MALNUTRISI**  
**YANG MENDAPAT TERAPI GLUTAMIN**

Oleh :  
**NURLEILA MAHARANI**  
0510920047-92

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji  
pada tanggal .....  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang kimia

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

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

**Dra. Anna Roosdiana,MApp.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 dibawah ini :

Nama : Nurleila Maharani

Nim : 0510920047

Jurusan : Kimia

Penulisan Tugas Akhir berjudul :

**STUDI AKTIVITAS MALTASE HASIL ISOLASI DARI JEJUNUM TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) MALNUTRISI YANG MENDAPAT TERAPI GLUTAMIN**

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 akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 2009  
Yang menyatakan

Nurleila Maharani  
(0510920047)

# **STUDI AKTIVITAS MALTASE HASIL ISOLASI DARI JEJUNUM TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) MALNUTRISI YANG MENDAPAT TERAPI GLUTAMIN**

## **ABSTRAK**

Malnutrisi merupakan keadaan kurang gizi yang disebabkan oleh rendahnya konsumsi karbohidrat dan protein dalam makanan sehari-hari. Kondisi ini dapat merusak sel-sel usus sehingga menurunkan aktivitas enzim pencernaan khususnya sukrase dan maltase. Dalam penelitian ini pemberian glutamin dipelajari untuk mengetahui perbaikan sel-sel mukosa usus dan peningkatan aktivitas maltase. Perbaikan sel-sel mukosa jejunum tikus ditunjukkan dengan gambaran histologi melalui pewarnaan *Hematoxylen-Eosin* (HE) dan profil protein dari maltase dengan teknik SDS-PAGE. Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kontrol, tikus malnutrisi, dan tikus yang mendapatkan terapi glutamin dengan dosis 300 mg/kg BB selama 15 hari. Aktivitas maltase ditentukan berdasarkan kadar glukosa yang dihasilkan oleh hidrolisis maltose. Glukosa diukur dengan spektrofotometri menggunakan metode Nelson-Somogyi. Aktivitas rata-rata maltase hasil isolasi dari jejunum tikus kontrol, tikus yang mengalami malnutrisi, dan tikus yang mendapat terapi glutamin berturut-turut adalah  $2,9011 \pm 0,0035$  U,  $2,0826 \pm 0,0712$  U,  $3,0196 \pm 0,0116$  U. Data yang diperoleh menunjukkan perbedaan yang nyata antara perlakuan malnutrisi dengan tikus yang mendapatkan terapi dan kontrol. Pemberian glutamin dapat memperbaiki histologi jejunum tikus malnutrisi yang ditunjukkan dengan perbaikan sel-sel mukosa usus pada tikus yang mendapatkan terapi dan dapat meningkatkan aktivitas maltase hasil isolasi dari jejunum tikus.

*Kata kunci:* Malnutrisi, glutamin, jejunum, maltase

# MALTASE ACTIVITY STUDIES ISOLATED FROM *Rattus Novergicus* JEJUNAL MALNUTRITION with GLUTAMIN THERAPY

## ABSTRACT

Malnutrition is conditions of prolong deficit dietary protein and carbohydrate intake. This condition enable to damage mucosa cell that can decrease intestinal enzyme activities, notably sucrase and maltase. In this research, glutamine was used to study its influence to mucosa cell remediation and the increase of maltase activities. Remediation of jejunum mucosa cell pointed in histological profile using *Hematoxylen-Eosin* staining and protein profile by SDS-PAGE technique. *Rattus norvegicus* was a model which consisted of three groups: control, malnutrition, and therapy by glutamine with concentration of 300 mg/kg body weight during 15 days. Maltase activity was determined on glucose which produced by hydrolysis maltose. Glucose measured by spectrophotometry with Nelson-Somogyi reagent. The result of average maltase activity control, malnutrition and glutamine therapy were  $2.9011 \pm 0.0035$  U,  $2.0826 \pm 0.0712$  U,  $3.0196 \pm 0.0116$  U respectively, which indicated significantly different. Administration of glutamine can repair jejunum histological malnutrition which shown by remediation mucosa cell and the increase of maltase activities from isolate of *Rattus novergicus* jejunum.

*Keywords:* Malnutrition, glutamine, jejunum, maltase

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kehadiran Allah SWT, karena hanya dengan rahmatNya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **“Studi Aktivitas Maltase Hasil Isolasi Dari Jejenum Tikus Putih(*Rattus norvegicus*) Malnutrisi Yang Mendapat Terapi Glutamin”** 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, serta dukungan dalam penyelesaian tugas akhir ini.
2. Dr. Diah Mardiana, MS, selaku dosen penasehat akademik yang telah memberikan bimbingan, arahan, dukungan, serta nasehat selama masa studi penulis.
3. Dr. Atikah, Apt., MSi, Drs. Budi Kamulyan, Drs. Suratmo, M.Sc, dan Drs. Danar P, MSi selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu untuk 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. Orangtua serta keluarga besar penulis yang telah memberikan doa, perhatian dan kasih sayang.
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, Juli 2009

Penulis

## DAFTAR ISI

Halaman

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xi
<b>DAFTAR ISTILAH</b> .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	4
1.5 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Malnutrisi .....	5
2.2 Glutamin .....	6
2.3 Enzim.....	7
2.4 Faktor-faktor yang mempengaruhi enzim .....	8
2.5 Maltase .....	9
2.6 Isolasi Maltase .....	10
2.7 Penentuan Aktivitas Maltase .....	10
2.8 Hewan Coba Tikus Putih ( <i>Rattus novergicus</i> ) .....	11
2.9 Jejunum .....	11
2.10 Elektroforesis SDS-PAGE.....	13
2.11 Hipotesis .....	14
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	15
3.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	15
3.2.1 Alat-alat .....	15
3.2.2 Bahan-bahan .....	15
3.2.2.1 Bahan Penelitian .....	15
3.2.2.2 Bahan Kimia.....	15

3.3 Metode Penelitian.....	16
3.4 Prosedur Penelitian.....	16
3.4.1 Preparasi Hewan Coba Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus strain Wistar</i> ) .....	16
3.4.2 Diet Makanan dan Pemberian Cairan .....	17
3.4.3 Terapi Glutamin .....	17
3.4.4 Pengambilan organ jejunum.....	17
3.4.5 Uji Kadar Albumin.....	18
3.4.6 Isolasi Maltase.....	18
3.4.7 Pembuatan Kurva Baku Glukosa menggunakan Reagen Nelson-Somogyi .....	19
3.4.7.1 Penentuan Maksimum Glukosa.....	19
3.4.7.2 Pembuatan Kurva Baku Glukosa.....	19
3.4.8 Uji Aktivitas Maltase .....	19
3.4.9 Penentuan Profil Protein dengan Teknik SDS-PAGE .....	20
3.4.9.1 Persiapan Gel.....	20
3.4.9.2 Injeksi Sampel dan Running.....	21
3.4.9.3 Perlakuan Setelah Running.....	21
3.4.9.4 Penentuan Massa Molekul Relatif.....	21
3.4.9 Pembuatan Preparat Jejunum .....	22
3.4.10 Pewarnaan <i>Hematoxylen-Eosin</i> .....	22
3.5 Analisis Data .....	23
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Perlakuan Malnutrisi .....	24
4.2 Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Maltase.....	25
4.3 Pengaruh malnutrisi terhadap histologi jejunum tikus dengan pewarnaan <i>Hematoxylen-Eosin</i> (HE) .....	30
4.4 Penentuan Massa Molekul relatif (Mr) Maltase .....	33
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan.....	37
5.2 Saran .....	37
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	38
<b>LAMPIRAN .....</b>	42

## DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1	Skema pengaruh kekurangan protein didalam tubuh.....	6
Gambar 2.2	Struktur Glutamin 3D.....	7
Gambar 2.3	Struktur Glutamin 2D.....	7
Gambar 2.4	Sistem Pencernaan Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	12
Gambar 2.5	Usus Halus Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	12
Gambar 4.1	Terapi glutamin secara oral pada tikus .....	25
Gambar 4.2.1	Reaksi hidrolisis Maltosa dengan Maltase sebagai katalis .....	27
Gambar 4.2.2	Proses pembentukan glutamin .....	28
Gambar 4.2.3	Metabolisme Glutamin .....	29
Gambar 4.2.4	Proses degradasi glutamin .....	30
Gambar 4.3	Hasil pewarnaan HE pada organ jejunum tikus (pembesaran 100x) .....	31
Gambar 4.3.1	Hasil pewarnaan HE pada Organ Jejenum Tikus .....	31
Gambar 4.3.2	Proses Pewarnaan Hemathoxylen pada inti .....	32
Gambar 4.3.3	Proses Pewarnaan Eosin pada sitoplasma.....	33
Gambar 4.4	Hasil running maltase pada tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) kontrol .....	34
Gambar 4.5	Hasil running maltase pada tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) malnutrisi .....	35
Gambar 4.4	Hasil running maltase pada tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) terapi .....	35
Gambar L.4.1	Kurva Serapan Larutan Glukosa 3.5 ppm .....	63
Gambar.L.5.1	Kurva Baku Glukosa pada $\lambda = 747 \text{ nm}$ .....	64
Gambar L.8.1	Kurva Massa Molekul Relatif (Mr) Protein Standar .....	71
Gambar L.12	Sertifikat Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang .....	75

## DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 4.1	Rataan Parameter Malnutrisi .....	24
Tabel 4.2	Rataan aktivitas maltase hasil isolasi dari jejunum tikus.....	26
Tabel 4.4	Perbedaan Massa Molekul Relatif (Mr) Protein pada setiap Ekstrak Kasar Maltase .....	36
Tabel L.2.1	Komposisi Larutan Separating Gel 12 % (1 plate).....	47
Tabel L.2.2	Komposisi Larutan Stacking Gel 3% (1 plate).....	47
Tabel 4.1.1	Data Limfa dan Timus Tikus Kontrol.....	57
Tabel 4.1.2	Data Limfa dan Timus Tikus Malnutrisi .....	57
Tabel 4.1.3	Data Limfa dan Timus Tikus Terapi .....	57
Tabel 4.2.1	Kadar Albumin Tikus Kontrol.....	57
Tabel 4.2.2	Kadar Albumin Tikus Malnutrisi.....	58
Tabel 4.2.3	Kadar Albumin Tikus Terapi.....	61
Tabel 4.3.1	Berat Badan Tikus Kontrol.....	61
Tabel 4.3.2	Berat Badan Tikus Sakit .....	62
Tabel 4.3.3	Berat Badan Tikus Terapi.....	62
Tabel L.5.1	Absorbansi Larutan Glukosa 3.5 ppm Pada Berbagai Panjang Gaelombang .....	62
Tabel L.6.1	Absorbansi Larutan Glukosa pada $\lambda = 747 \text{ nm}$ ..	63
Tabel L.7.1	Data Absorbansi Kompleks Molibdenum Biru..	64
Tabel L.7.2	Data Kadar Glukosa.....	65
Tabel L.7.3	Aktivitas Maltase.....	66
Tabel L.8.1	Analisa Ragam Satu Arah Aktivitas Maltase .....	69
Tabel L.8.2	Hasil Uji BNT 1 % Aktivitas Maltase .....	70
Tabel L.9	Harga Rf dan Massa Molekul Relatif (Mr) Protein Standar .....	71
Tabel L.10	Harga Massa Molekul Relatif (Mr) beberapa Pita Protein pada setiap Ekstrak Kasar Maltase.....	72

## DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1	Skema Kerja Penelitian .....	42
Lampiran 2	Preparasi Larutan.....	43
Lampiran 3	Diagram Alir Penelitian.....	48
Lampiran 4	Data Parameter Malnutrisi.....	57
Lampiran 5	Penentuan Maksimum Larutan Glukosa.....	62
Lampiran 6	Kurva Baku Larutan Glukosa.....	63
Lampiran 7	Aktivitas Maltase pada Ekstrak Kasar Maltase.	64
Lampiran 8	Data dan Uji statisik Aktivitas Maltase.....	69
Lampiran 9	Pembuatan Kurva Massa Molekul Relatif (Mr) Protein Standar .....	70
Lampiran 10	Penentuan Massa Molekul Relatif (Mr) Maltase pada Ekstrak Kasar Maltase.....	71
Lampiran 11	Uji Laboratorium Makanan Tikus .....	74
Lampiran 12	Sertifikat Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang .....	75

## DAFTAR ISTILAH

### Singkatan/Istilah

$\mu\text{g}$	mikro gram
$\text{mM}$	milli Molar
$\text{mL}$	milli Liter
$\mu\text{L}$	mikro Liter
ppm	part per million
rpm	radian per minutes
Mr	Massa molekul relatif
kDa	kilo Dalton ( Satuan )
$R_f$	Internasional Massa Molekul Relatif Protein)
PBS	Retardation factor
PMSF	Phosphate Buffer Saline
PFA	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
APS	Paraformaldehida
AST	Ammonium Persulphate
ALT	Aspartate Transaminase
UGB	Alanin Tranaminase
LGB	Upper Gel Buffer
RSB	Lower Gel Buffer
SDS-PAGE	Reducing Sample Buffer
TEMED	Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
UV-Vis	$N',N',N',N'$ -tetramethyl ethylene diamine
Jejunum	Ultra Violet-Visible
Ad libitum	Bagian dari usus halus setelah duodenum
Villi	dibatasi
Poliferasi	Bagian dari mukosa usus yang menyerap makanan
Mounting	Pertumbuhan
Enterosit	(perkembangbiakan)

### Keterangan

$\mu\text{g}$	mikro gram
$\text{mM}$	milli Molar
$\text{mL}$	milli Liter
$\mu\text{L}$	mikro Liter
ppm	part per million
rpm	radian per minutes
Mr	Massa molekul relatif
kDa	kilo Dalton ( Satuan )
$R_f$	Internasional Massa Molekul Relatif Protein)
PBS	Retardation factor
PMSF	Phosphate Buffer Saline
PFA	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
APS	Paraformaldehida
AST	Ammonium Persulphate
ALT	Aspartate Transaminase
UGB	Alanin Tranaminase
LGB	Upper Gel Buffer
RSB	Lower Gel Buffer
SDS-PAGE	Reducing Sample Buffer
TEMED	Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
UV-Vis	$N',N',N',N'$ -tetramethyl ethylene diamine
Jejunum	Ultra Violet-Visible
Ad libitum	Bagian dari usus halus setelah duodenum
Villi	dibatasi
Poliferasi	Bagian dari mukosa usus yang menyerap makanan
Mounting	Pertumbuhan
Enterosit	(perkembangbiakan)

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar belakang

Malnutrisi merupakan keadaan kurang gizi akibat rendahnya asupan karbohidrat dan protein. Malnutrisi banyak ditemukan di Indonesia, karena masih banyak daerah mengalami rawan pangan yang mempunyai kemampuan ekonomi kurang memadai sehingga amat rentan terhadap terjadinya malnutrisi. Hal ini merupakan potret buruk pemenuhan kebutuhan mendasar bagi masyarakat Indonesia. Organisasi pangan dunia (FAO) mencatat pada kurun waktu 2000-2002 di Indonesia terdapat sekitar 13,8 juta penduduk yang mengalami malnutrisi. Menurut United Nation Children's Found (UNICEF) sekitar 27,3% anak Indonesia pada tahun 2003 menderita malnutrisi. Depkes RI melaporkan bahwa pada tahun 2004 jumlah anak yang mengalami malnutrisi sekitar 4,1 juta dan pada tahun 2007 meningkat menjadi 5,1 juta (Wiwan, 2008).

Kondisi ekonomi bangsa Indonesia yang semakin memburuk menyebabkan banyak penduduk Indonesia yang tidak mampu membeli beras untuk memenuhi kebutuhan makan sehari-hari. Di daerah Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur dan sebagian wilayah NTT kebanyakan penduduk yang tidak mampu menggunakan nasi aking sebagai makanan pokok sebagai pengganti beras. Menurut penelitian yang dilakukan oleh IPB dalam nasi aking terkandung protein dan zat gizi lain yang tidak memadai untuk kebutuhan tubuh, namun banyak bakteri pembusuk yang akan menimbulkan penyakit (Suprapto, 2008)

Malnutrisi sangat berpengaruh pada sistem *gastrointestinal* dan dalam waktu yang lama menyebabkan infeksi mikrovilli usus. Infeksi yang terjadi akan mengakibatkan perubahan bentuk membran mukosa. Hal ini disebabkan karena menurunnya jumlah sel yang menurunkan pertumbuhan enterosit dan migrasi sel. Sehingga terjadi penyimpangan fungsi usus yang menyebabkan malabsorpsi. Penyimpangan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas disakaridase pada usus khususnya maltase dan sukrase (Islam, *et. al.*, 2006).

Maltase merupakan enzim yang terdapat dalam lapisan usus halus yang berperan untuk memecah disakarida menjadi gula

sederhana, kemudian diserap dalam darah melalui dinding usus. Pada kondisi malnutrisi terjadi infeksi pada usus sehingga jumlah dan aktivitas maltase akan berkurang. Hal ini akan mengakibatkan maltosa sebagai substrat maltase tidak optimal dicerna (Neale, 1995).

Kerusakan mukosa usus merupakan gejala yang terjadi karena peradangan yang ditimbulkan karena malnutrisi. Glutamin mempunyai efek penyembuhan pada peradangan akibat radiasi, trauma pembedahan, peradangan isemik dan sito-toksik obat (Tannuri, *et. al*, 2002).

Glutamin merupakan salah satu asam amino non essensial. Glutamin terdapat dalam otot dan merupakan bahan bakar utama sistem pencernaan dan sistem imun, juga memegang peranan penting pada siklus nitrogen dari otot ke seluruh tubuh. Selama keadaan stress atau infeksi, glutamin digunakan berlebih oleh tubuh, sehingga pada kondisi tersebut sangat dibutuhkan tambahan glutamin (Corey, 2008).

Menurut Tannus, *et. al* (2005), glutamin mempunyai dua gugus nitrogen yaitu amida dan amina yang sangat penting untuk transport nitrogen antar jaringan dan bagian luar sampai bagian dalam organ. Selain itu glutamin merupakan perkusor proses glukoneogenesis dari amoniogenesis ginjal dan neurotransmitter pada asam -aminobutirat dan glutamat, juga menghasilkan nitrogen untuk sintesa purin, purimidin dan nukleotida.

Selama ini glutamin digunakan untuk menyembuhkan peradangan yang diakibatkan oleh penyakit tumor *cachexia*. Pemberian glutamin pada penyakit ini sebagai suplemen sebanyak 200 mg/kg. Menurut penelitian sebelumnya, glutamin lebih efektif diberikan secara enteral. Pada proses *in vitro* glutamin dapat meningkatkan sistem imun, namun pertumbuhan sel tumor masih belum bisa diturunkan sehingga masih terjadi peradangan (Barbara, 2001).

Mekanisme glutamin dalam memperbaiki kerusakan usus akibat malnutrisi belum diketahui dengan jelas. Sehingga perlu dipelajari kemampuan glutamin untuk memperbaiki kerusakan usus yang akan berpengaruh pada aktivitas enzim disakarida usus terutama maltase.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka permasalahan yang akan dikaji pada penelitian ini diantaranya:

1. Apakah pemberian glutamin pada tikus malnutrisi dapat meningkatkan jumlah maltase hasil isolasi dari jejunum tikus malnutrisi?
2. Apakah pemberian glutamin pada tikus malnutrisi dapat memperbaiki histologis organ jejunum?

## **1.3 Batasan Masalah**

Batasan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Hewan coba yang dipergunakan adalah homogen, yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berusia 2 bulan dengan berat badan  $\pm$  100 gram yang berasal dari Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Brawijaya.
2. Perlakuan diet makanan dengan pemberian karak @ 20 gr/ekor/hari dan pemberian minuman secara *ad libitum* selama 30 hari.
3. Pemberian dosis glutamin untuk terapi pada hewan coba dilakukan setiap hari secara per oral dengan dosis yaitu 300 mg/kg BB/ekor/hari selama 15 hari.
4. Aktivitas ekstrak kasar maltase dinyatakan dalam satuan Unit (U), dimana satu unit aktivitas ekstrak kasar maltase menunjukkan banyaknya  $\mu$ mol maltosa yang dihasilkan oleh reaksi hidrolisis setiap mililiter (mL) maltase per menit pada kondisi optimumnya (pH 6.5, temperatur 37°C, waktu inkubasi 15 menit).
5. Gambaran histologi jejunum dilakukan dengan metode pewarnaan *Hematoxylen-Eosin* yang diamati dibawah mikroskop cahaya binokuler.
6. Perlakuan pada hewan coba sesuai dengan standar laik etik Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No 29-KE.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini, diantaranya :

1. Untuk mengetahui pengaruh terapi glutamin terhadap meningkatnya aktivitas maltase hasil isolasi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) malnutrisi sebagai hewan coba.
2. Untuk mengetahui perbaikan histologis organ jejunum hasil isolasi dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) malnutrisi yang telah diterapi oleh glutamin.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat digunakan sebagai pengembangan terapi malnutrisi secara klinis.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

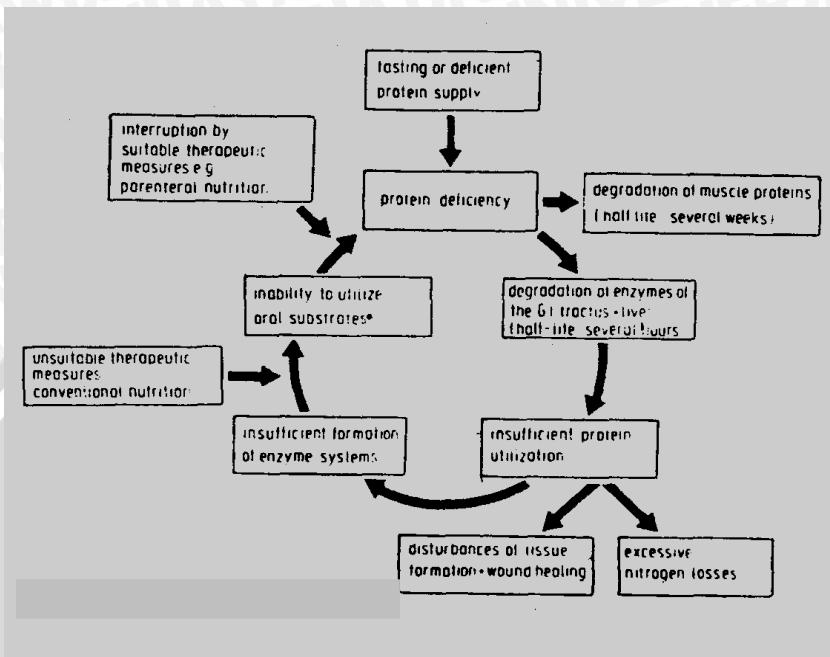
#### 2.1 Malnutrisi

Malnutrisi adalah kekurangan asupan dari zat-zat makanan terutama protein dan energi. Malnutrisi dapat mempengaruhi pertumbuhan, perkembangan serta dapat memperlambat proses penyembuhan. Tahapan malnutrisi yang terjadi ada 4 (Hidajat dkk, 2007) :

1. Perubahan kadar zat gizi dalam darah dan jaringan
2. Perubahan kadar enzim
3. Kelainan fungsi pada organ dan jaringan tubuh
4. Timbulnya gejala-gejala penyakit dan kematian.

Malnutrisi yang bertahap menyebabkan infeksi dan dalam waktu yang lama menyebakan kerusakan mukosa usus. Sehingga terjadi penyimpangan fungsi usus seperti malabsorpsi nutrisi. Malnutrisi mempengaruhi karakteristik sistem gastrointestinal baik lokal maupun sistematisnya. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa perusakan mukosa usus pada malnutrisi disebabkan karena menurunnya jumlah sel, menurunnya perkembangan enterosit, dan menurunnya migrasi dari lubang sel sepanjang villi. Kerugian dan hal yang penting dari malnutrisi adalah menurunkan aktivitas laktase, sukrase dan maltase akibat dari rusaknya membran mukosa usus (Islam, et. al., 2006).

Hendrotomo dan Muhardi (1993) menyatakan pada malnutrisi, katabolisme protein fungsional seperti enzim, kalau dibiarkan berlarut-larut akan mengakibatkan gangguan fungsi organ. Pada kondisi ini otot rangka banyak kehilangan nitrogen. Secara praktis kehilangan setiap gram nitrogen kurang lebih sama dengan kehilangan N (Ar nitrogen)  $\times$  6,25  $\times$  5 gram jaringan otot. Pada traktus gastrointestinal dan kelenjar-kelenjar pencernaan, ini berarti gangguan pada pengolahan, penyerapan dan pemakaian dari bahan makanan (termasuk protein) yang diberikan per oral.



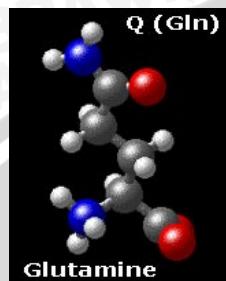
Gambar 1. Skema pengaruh kekurangan protein didalam tubuh  
(Hendrotomo dan Muhardi, 1993)

## 2.2 Glutamin

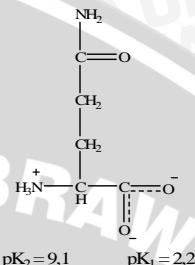
Glutamin merupakan salah satu asam amino non essensial, karena dapat dihasilkan sendiri oleh tubuh. Rantai sampingnya adalah suatu amida. Glutamin dibuat dengan mengganti rantai samping hidroksil asam glutamat dengan gugus fungsional amina. Glutamin merupakan asam amino penting yang digunakan dalam proses anabolik pada otot dan melindungi tubuh dari kerusakan akibat kelebihan bekerja. Sebagian besar otot menyimpan dan mengeluarkan glutamin untuk menjaga sirkulasi plasma darah dari satu jaringan ke jaringan lain (Sparkman, 1996).

Glutamin memiliki struktur khas, dimana setiap molekulnya memiliki dua atom nitrogen berasal dari amonia dari jaringan, khususnya otak. Glutamin juga mengikat amonia pada sistem urin yang dihancurkan oleh glutaminase dalam ginjal. Karena struktur yang khas dari glutamin yaitu dua buah atom nitrogen pada dua sisi

rantai, menjadikannya pentransport nitrogen utama ke sel otot untuk disintesis pada pertumbuhan otot (Sparkman, 1996).



Gambar 2. Struktur Glutamin 3D  
(Hugo, 2003)



Gambar 3. Struktur Glutamin 2D  
(Hugo, 2003)

Glutamin (Gln) merupakan asam amino terbesar pada plasma darah dan didapatkan dari sintesis semua jaringan pada tubuh. Glutamin terdapat dalam darah dan asam amino bebas pada tubuh dalam jumlah yang sangat besar. Asam amino ini diperlukan untuk sirkulasi plasma darah dari satu jaringan ke jaringan lain. Pada mamalia, fungsi utama glutamin adalah pada usus dan jaringan epitel saluran pencernaan (Tannus, *et. al*, 2005).

Glutamin sangat berpengaruh kuat pada sistem imun dan mampu untuk mengurangi alkohol dan kelebihan gula. Ikatan peptida glutamin lebih stabil dalam bentuk larutan, dengan temperatur tinggi dan pH rendah. Bentuk L-glutamin cenderung mudah dipecahkan menjadi ammonia dan asam glutamat dalam larutan (Convia, 2005).

### 2.3 Enzim

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalis, dimana senyawa ini dapat mempercepat proses reaksi tanpa habis breakksi dalam suatu reaksi kimia. Enzim bekerja secara spesifik, artinya setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu jenis senyawa atau reaksi kimia. Hal ini disebabkan struktur kimia tiap-tiap enzim berbeda dan bersifat tetap. Enzim ini akan kehilangan aktivitasnya akibat panas, kondisi asam atau basa yang ekstrim, pelarut organik atau keadaan-keadaan lain yang menyebabkan denaturasi protein (Lehninger, 1997).

Ada dua tipe enzim, enzim ekstraseluler (eksoenzim) atau enzim diluar sel dan enzim intraseluler (endoenzim) atau enzim di dalam

sel. Fungsi utama dari eksoenzim adalah melangsungkan perubahan-perubahan pada nutrien di sekitarnya sehingga memungkinkan nutrien tersebut memasuki sel. Misalnya, enzim amilase menguraikan zat pati menjadi unit-unit gula yang lebih kecil. Endoenzim mensintesis bahan seluler dan menguraikan nutrien untuk menyediakan energi yang dibutuhkan oleh sel, misalnya heksokinase mengkatalisis fosforilasi glukosa dan heksosa (senyawa-senyawa gula sederhana) didalam sel (Waluyo, 2004).

#### 2.4 Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim

Secara umum, aktivitas enzim dipengaruhi oleh temperatur, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, pH, adanya inhibitor dan aktivator berupa kofaktor atau koenzim jika berupa molekul organik. Dalam melakukan aktivitasnya untuk mengkatalisis suatu reaksi, kerja enzim dipengaruhi oleh pH, temperatur, waktu reaksi enzimatis, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, aktivator dan inhibitor (Lehninger, 1997).

Kecepatan reaksi akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan terus meningkat dengan nilai yang semakin kecil hingga mencapai titik batas dimana enzim jenuh oleh substrat dan tidak berfungsi lebih baik. Titik batas itu disebut kecepatan maksimum ( $V_{maks}$ ) (Lehninger, 1997). Menurut Leonor Michaelis dan Maud Menten, penggabungan enzim (E) dengan substrat (S) merupakan reaksi yang dapat balik dan berlangsung relatif cepat, membentuk kompleks enzim-substrat (ES). Selanjutnya, kompleks ES terurai dan membentuk produk reaksi (P) dan enzim bebas (E). Reaksinya dapat digambarkan sebagai berikut (Patel, 1996):



dimana:

E = enzim

E-S = kompleks enzim substrat

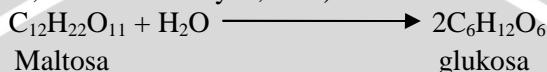
S = substrat

P = produk

$k_1$ ,  $k_2$ , dan  $k_3$  = konstanta laju reaksi

## 2.5 Maltase

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



Malnutrisi menyebabkan mukosa usus mengalami kerusakan sehingga menurunkan aktivitas enzim disakarida yaitu laktase, sukrase dan maltase (Islam, et.al., 2006). 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 *celiac*, sariawan tropikal dan infeksi usus (Fergus, 1995).

Maltase terdapat pada membran *brush-border* terutama pada sel-sel villi dan mukosa usus halus yang berfungsi menghidrolisis maltosa. Maltase pada membran *brush-border* memiliki berat molekul sebesar 81 kDa (Jacob *et. al.*, 1999).

Maltosa merupakan produk utama kerja amilase terhadap zat pati atau glikogen. Maltosa tersusun dari dua sisa D-glukosa, satu D-glukosa dihubungkan lewat C<sub>1</sub> nya ke gugus hidroksil pada C<sub>4</sub> pada D-glukosa yang lainnya dengan konfigurasi ikatan glikosidanya. Ikatan glukosidik dalam bentuk anomeric D-maltosa merupakan gula pereduksi, sebab satu D-glukosanya mempunyai gugus aldehid yang potensial (Montgomery, *et al*, 1993).

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

## 2.6 Isolasi Maltase

Isolasi atau pemurnian enzim adalah proses memisahkan protein tertentu dari ekstrak kasar seluruh sel yang mengandung banyak unsur lain (Robyt, 1991).

Menurut Robyt (1991), 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 dibawah 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.

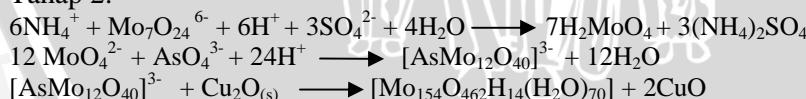
## 2.7 Penentuan Aktivitas Maltase

Aktivitas maltase ditentukan dengan cara mengukur kadar D-glukosa yang terbentuk dengan metode spektrofotometri. Metode ini menggunakan reagen Nelson dan Somogyi, dimana metodenya melibatkan dua tahap reaksi yaitu reaksi D-glukosa dengan reagen Nelson menghasilkan produk  $\text{Cu}_2\text{O}$  berupa endapan merah bata. Kemudian reaksi kedua adalah antara  $\text{Cu}_2\text{O}$  dengan reagen arsenomolibdat.

## Tahap 1:



## Tahap 2:



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 Molibdenum biru, yang mempunyai panjang gelombang maksimum  $\pm$  740 nm dan intensitas ini tidak mengalami perubahan dalam 24 jam (Vogel,1994).

Untuk penentuan kadar D-glukosa digunakan persamaan Lambert-Beer  $A = b \cdot c$  (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 b (Underwood,1993).

## 2.8 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*)

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

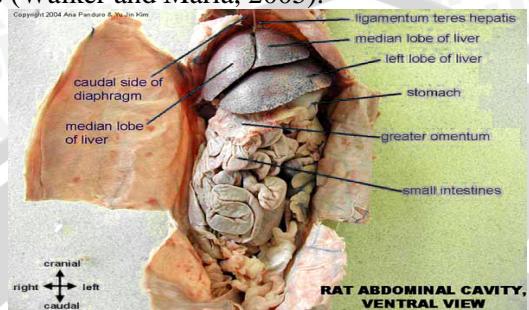
Kingdom	:	Animalia
Filum	:	Chordata
Sub filum	:	Vertebrata
Klass	:	Mammalia
Ordo	:	Rodentia
Sub Ordo	:	Sciurognathi
Familia	:	Muridae
Sub Familia	:	Murinae
Genus	:	<i>Rattus</i>
Spesies	:	<i>Rattus norvegicus</i> strain Wistar

Malnutrisi yang kronis dapat menyebabkan perubahan morfologi dan morfometrik dari usus tikus. Nutrisi yang tidak seimbang, khususnya dalam waktu yang lama, akan menyebabkan beberapa senyawa yang dibutuhkan dalam keadaan normal menjadi berkurang, proses biokimia akan sulit diketahui ketika organism dalam keadaan homeostasis (Natali, et.al, 2000).

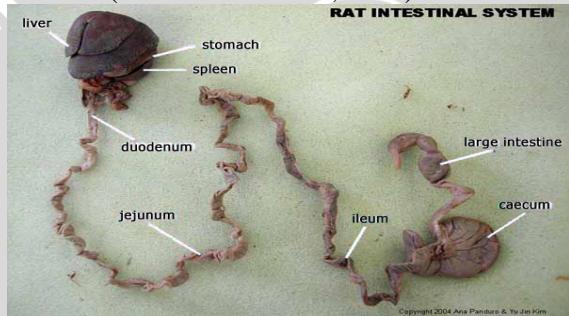
## 2.9 Jejunum

Usus halus atau usus kecil letaknya berdekatan dengan perut yaitu pada pyrolus dan bagian pertama dari usus halus adalah duodenum, yang mempunyai panjang sekitar 95 hingga 100 mm pada usus 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 memenuhi bagian sebelah kanan perut. Ileum merupakan

bagian terakhir dari usus halus dan panjangnya antara 25 hingga 35 mm pada tikus (Walker and Maria, 2005).



Gambar 4. Sistem Pencernaan Tikus (*Rattus norvegicus*)  
(Walker and Maria, 2005)



Gambar 5. Usus Halus Tikus (*Rattus norvegicus*)  
(Walker and Maria, 2005)

Ketiga bagian usus halus masing-masing memiliki peranan yang berbeda sebagai tempat penyerapan nutrisi-nutrisi spesifik. Untuk jejunum, bagian usus halus ini lebih banyak menyerap asam-asam amino dan beberapa jenis gula (Reinhard, 2002). Dimana rentang pH pada usus halus, yaitu duodenum 4-6, jejunum 6-7, dan ileum 7-8 (Aiache *et al.*, 1993).

Bagian dari usus halus, yaitu jejunum tersusun atas sel-sel yang menghasilkan beberapa enzim intraseluler (endoenzim), seperti (Aiache *et al.*, 1993):

- Erepsine, gabungan peptidase yang menyempurnakan pemecahan protein;
- Nuklease dan nukleotidase yang memecah dislokasi asam nukleat berinti purin dan pirimidin;

- c. Enzim yang menghidrolisis gula, invertase atau sakarose menghidrolisis sakarosa, maltase menghidrolisis maltosa, laktase menghidrolisis laktosa.

Umumnya enzim-enzim ini dihasilkan pada bagian sel-sel mukosanya dan dapat bekerja apabila terjadi pengelupasan ataupun lisis pada sel mukosa. Penurunan suplay kalori, protein atau malnutrisi menyebabkan dinding usus pada tikus tidak terpelihara, membuktikan bahwa terjadi perusakan yang menurunkan ketebalan pada dinding usus jejunum. Jika protein yang dibutuhkan oleh tubuh berkurang maka akan mengurangi proses penyimpanan yang menyebabkan fungsi morfologi dari organisme akan berubah. (Natali, *et.al*, 2000).

## 2.10 Elektroforesis SDS-PAGE

Elektroforesis merupakan proses bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik atau gerakan partikel (koloid) yang bermuatan melalui suatu gel karena pengaruh medan listrik. Gel poliakrilamid dan agarosa merupakan matriks penyangga yang banyak dipakai untuk separasi protein dan asam nukleat. Elektroforesis yang menggunakan matriks berupa gel poliakrilamida (PAGE = *polyacrilamida gel electrophoresis*) untuk separasi sampel protein (Watson, 2008).

Faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan migrasi dari molekul protein adalah ukuran molekul protein, konsentrasi gel, buffer (penyangga), medium penyangga, kekuatan voltase, temperatur medium saat proses elektroforesis berlangsung. Jika temperatur tinggi akan mempercepat proses migrasinya protein dan sebaliknya jika temperatur rendah akan mengurangi kekuatan bermigrasinya protein (Soedarmadji, 1996; Patel, 1994).

Hasil elektroforesis akan didapatkan pita-pita protein yang terpisahkan berdasarkan berat molekulnya. Tebal tipisnya pita yang terbentuk dari pita protein menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai berat molekul yang sama yang berada pada posisi pita yang sama. Hal ini sejalan dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yakni molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik. Molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan (Soedarmadji, 1996).

## 2.11 Hipotesis

Berdasarkan uraian di atas, hipotesis yang dapat diambil antara lain :

1. Terapi glutamin dapat meningkatkan aktivitas maltase hasil isolasi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) malnutrisi sebagai hewan coba.
2. Terapi glutamin dapat memperbaiki histologis organ jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) malnutrisi.



## BAB III

### Metode Penelitian

#### 3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Brawijaya Malang. Waktu penelitian yaitu pada bulan Januari hingga Mei 2009.

#### 3.2 Alat dan Bahan penelitian

##### 3.2.1 Alat-alat

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain: bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, seperangkat alat destilasi, seperangkat alat gelas, mortar, mikropipet, rak tabung reaksi, penangas air, waterbath, stirer, botol semprot, tabung mikro, tabung polipropilene, lemari pendingin, digital pH meter (Inolab-WTW), neraca analitik (Sartorius Basic P-160), tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi (Denley tipe BR 401), inkubator (Memmert), vortex (Guo-Huq), sonikasi (Branson 200), spektrofotometer UV-Vis, Mikroskop Cahaya, hot plate, dan Mini-Protean Tetra Cells (Biorad), COBAS Mira.

##### 3.2.2. Bahan-bahan

###### 3.2.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang dipergunakan pada penelitian ini adalah hewan coba berupa 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, Glutamin, Karak (spoil rice).

###### 3.2.2.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah Formaldehida 35%, dinatrium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany, M=141,96 g/mol), NaCl (Merck KgaA, 64271 Darmstadt, Germany), KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , HCl, Tween,  $\text{NaN}_3$  1%, glisin, Tris-HCl, glukosa, maltosa,  $\text{KMnO}_4$  1 M, Fenil Metil Sulfonil Fluoride (PMSF), Na-tartrat . 4 $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidrat,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat,  $\text{CuSO}_4$  . 5 $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , ammonium molibdat,  $\text{NaHAsO}_4$  . 7 $\text{H}_2\text{O}$ , etanol absolut 98%, metanol absolut 98%, acrylamide ( $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$ ) Pharmacia Biotech AB

Sweden), bis-acrylamide ( $C_2H_{10}O_2N_2$  Bio Basic Inc.), 2-merkaptoetanol, sodium dodecyl sulphate (SDS,  $C_{12}H_{25}NaO_4S$  Bio Basic Inc.), ammonium persulphate (APS,  $(NH_4)_2S_2O_8$  Bio-Rad Lab.), N,N,N',N' tetramethyl ethylene diamine (TEMED),  $(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$  Pharmacia Biotech AB Sweden), -merkaptoetanol ( $C_2H_6O_5$  SIGMA-Aldrich Co. Germany), Tris ( $C_4H_{11}NO_3$  MP Biomedicals Inc. Germany), bromophenol blue ( $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$  Merck KgaA. 64271 Darmstadt, Germany), commassive brilliant blue R-350 ( $C_{45}H_{44}N_3O_7S_2Na$  SIGMA-Aldrich Co. Germany), xilol, parafin, hematoxylon, eosin dan akuades.

### 3.3 Metodologi Penelitian

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

1. Preparasi hewan coba.
2. Pemberian makanan berdasarkan ketentuan malnutrisi protein (diet makanan) dan pemberian minuman *ad libitum*.
3. Terapi glutamin dengan dosis 300 mg/kg BB.
4. Pembedahan dan pengambilan organ jejunum.
5. Isolasi maltase.
6. Pembuatan kurva baku glukosa metode Nelson-Somogyi.
7. Uji aktivitas maltase.
8. Penentuan profil protein hasil isolasi dari organ jejunum dengan teknik SDS-PAGE.
9. Pembuatan preparat jejunum.
10. Pewarnaan Hematoxylen-Eosin.

### 3.4 Prosedur Penelitian

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

Preparasi hewan coba dilakukan selama dua bulan di laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Tikus dibagi menjadi tiga kelompok yaitu: (1) Kelompok kontrol yaitu yang tidak mendapat perlakuan apapun sebanyak 5 ekor tikus, (2) Kelompok tikus yang diberi perlakuan dengan diet makanan dan pemberian *ad libitum* BB tikus sebanyak 5 ekor, (3) Kelompok tikus yang diberi perlakuan dengan diet makanan, pemberian minuman secara *ad libitum* dan terapi glutamin sebanyak 300 mg/kg BB tikus.

Setelah tikus beradaptasi dengan lingkungan kandang di laboratorium, tikus diperlakukan sesuai dengan kelompok yang telah direncanakan. Kelompok 1 adalah tikus kontrol dimana tikus tidak dikenai perlakuan apapun. Kelompok 2 tikus yang diberi perlakuan dengan diet makanan dan pemberian minuman *ad libitum*. Kelompok 3 tikus yang diberi perlakuan dengan diet makanan dan pemberian minuman *ad libitum* setelah itu dilakukan terapi glutamin sebanyak 300 mg/kg BB tikus. Kemudian tikus dibunuh pada hari ke 31 untuk pengambilan jejunum sebagai organ sampel, dilakukan pengamatan pada jejunum dan diisolasi maltase pada jejunum untuk diamati aktivitasnya.

#### **3.4.2 Diet Makanan dan Minuman**

Makanan yang diberikan adalah karak (nasi basi yang dikeringkan). Pemberian makanan sebanyak 20 gram untuk tiap harinya dan minuman diberikan secara *ad libitum* untuk tikus kelompok 2 dan 3. Perlakuan ini berlangsung selama 15 hari. Setelah itu untuk tikus kelompok 3 akan diterapi dengan glutamin selama 15 hari.

#### **3.4.3 Terapi glutamin**

Terapi glutamin dalam bentuk cairan diberikan setelah hari ke 16 pelakuan diet makanan dan pemberian minuman yang dibatasi. Terapi ini diberikan dengan dosis tertentu, untuk tikus kelompok 1 dan kelompok 2, tidak diberikan terapi, sedangkan untuk tikus kelompok 3 merupakan tikus yang diberi perlakuan dengan diet makanan, terapi glutamin sebanyak 300 mg/kg berat badan. Terapi glutamin ini diberikan secara per-oral (disonde) selama 15 hari.

#### **3.4.4 Pengambilan Organ jejunum**

Pengambilan organ jejunum pada hewan coba tikus putih dilakukan pada hari ke 31 setelah 15 hari program diet makanan dan 15 hari terapi glutamin. 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 bagian perut di atas pada papan pembedahan. Kemudian diambil bagian ususnya, 25 cm jejunum. Jejunum mula-mula dibilas dengan NaCl-fis 0.9% dingin. Kemudian jejunum dibagi menjadi dua bagian, yaitu

$\frac{1}{4}$  bagian dimasukkan dalam larutan PFA(*Paraformaldehida*) 10 % dan  $\frac{3}{4}$  bagian dimasukkan dalam larutan PBS-azida pH 7.4.

### **3.4.5 Uji Kadar Abumin**

Pengujian kadar albumin dilakukan dengan menggunakan *COBAS Mira* yang merupakan alat kimia analisis berfungsi untuk menganalisis kadar albumin dan beberapa akses biokimia yang biasa digunakan dalam bidang kedokteran. Kadar albumin di uji dengan memasukkan 1 mL darah yang telah diambil dari jantung hewan coba kedalam kuvet kemudian dimasukkan dalam alat *COBAS Mira* dianalisis selama 25 detik.

Penentuan kadar albumin dilakukan dengan mereaksikan albumin dan asam fosfotungsat-fosfomolibdad pada suasana alkalis akan memberikan warna biru yang intensitasnya bergantung pada konsentrasi protein (albumin) yang terkandung dalam sampel. Konsentrasi protein diukur berdasarkan optikal density pada panjang gelombang 600 nm. Untuk mengetahui banyaknya protein dalam larutan, terlebih dahulu dibuat *kurva standar* yang melukiskan hubungan antara konsentrasi dan optical dencity (OD).

### **3.4.6 Isolasi Maltase**

Isolasi maltase dilakukan pada bagian organ jejunum. Tahapannya adalah mula-mula organ jejunum ditimbang 0,5 gram kemudian 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 di atas balok es. Selanjutnya, ditambahkan dengan larutan PBS-Tween : PMSF (9 : 1) sebanyak 2 mL dan dipindahkan ke dalam tabung polipropilen steril. Setelah itu di homogenkan dengan vortek selama 10 menit, dipecah dinding selnya dengan sonikator selama 10 menit, dan dipisahkan endapannya dengan sentrifus selama 15 menit (6.000 rpm). Supernatannya diambil, kemudian ditambahkan etanol absolut dingin dengan perbandingan volume 1 : 1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Berikutnya, dipisahkan endapannya dengan sentrifus selama 15 menit (10.000 rpm), diambil endapannya, dan dikeringkan hingga bau etanol hilang. Endapan dilarutkan dalam Tris-Cl 0.02 M pH 6.8 dingin dengan perbandingan volume 1 : 1.

### **3.4.7 Pembuatan Kurva Baku Glukosa Metode Nelson-Somogyi**

#### **3.4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum**

Penentuan panjang gelombang maksimum larutan glukosa dilakukan dengan langkah pertama disiapkan larutan glukosa standar dengan konsentrasi 35 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 diencerkan larutan dengan air bebas reduktor dalam labu ukur 10 mL. Berikutnya, diukur absorbansi larutan glukosa standar tersebut diukur pada kisaran 500-800 nm, dimana larutan blanko yang digunakan adalah 1 mL air bebas reduktor ke dalam tabung reaksi dan diperlakukan sama dengan larutan glukosa standar.

#### **3.4.7.2 Pembuatan Kurva Baku Glukosa**

Pembuatan kurva standar glukosa yang harus dilakukan adalah mula-mula disiapkan larutan glukosa standar dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, dan 35 ppm. Selanjutnya, diambil masing-masing larutan standar glukosa sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam 10 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 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 maksimumnya, yaitu 747 nm.

### **3.4.8 Uji Aktivitas Maltase**

Uji aktivitas Maltase dilakukan dengan langkah awal adalah diambil crude enzim maltase hasil isolasi masing-masing sebanyak 40  $\mu$ L, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, dan

ditambahkan larutan substrat maltosa 36 mM masing-masing sebanyak 100  $\mu$ 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. Berikutnya, diencerkan larutan pada masing-masing tabung reaksi tersebut dengan air bebas reduktor dalam labu ukur 10 mL. Kemudian diukur absorbansinya pada maksimumnya, yaitu 747 nm.

Aktivitas enzim maltase dinyatakan dalam unit. Satu unit aktivitas enzim adalah banyaknya  $\mu$ g gula pereduksi yang dihasilkan oleh 1 mL enzim dalam setiap menit. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh ke dalam persamaan linier kurva standar gula pereduksi, kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut (Lehninger, 1997) :

Dimana:

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

$p$  = Volume maltase (ml)

$q$  = Waktu reaksi (menit)

$f_p$  = Faktor pengenceran = 100

$M_r$  = Massa molekul relatif glukosa (180,157  $\mu$ g/ $\mu$ mol)

### **3.4.9 Penentuan Profil Protein Hasil Isolasi dari Jejenum dengan Teknik SDS-PAGE**

#### **3.4.9.1 Persiapan Gel**

Pada persiapan gel, langkah pertama yang harus dilakukan adalah disiapkan plat gel dengan cara merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat  $\pm$  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, dd  $H_2O$ , ammonium persulphate (APS), N,N,N',N'-tetramethyl

ethylene diamine (TEMED) yang dilarutkan menjadi satu dalam akuades steril. Kemudian dituangkan larutan separating gel dalam plat dengan menggunakan pipet, dituangkan pula akuades steril di atas gel, dan dibiarkan 10-30 menit hingga gel memadat. Setelah gel mulai terbentuk atau memadat, dibuang akuades yang berada di atas gel tersebut. Stacking gel dibuat dari Upper Gel Buffer (UGB), T-Acryl, APS, TEMED dan dilarutkan menjadi satu dalam akuades 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.

#### **3.4.9.2 Injeksi Sampel dan Running**

Ekstrak kasar maltase hasil isolasi diambil 150  $\mu\text{L}$ , ditambahkan 150  $\mu\text{L}$  *Reducing Sample Buffer* (RSB), dan dipanaskan pada penangas air pada suhu 100°C selama 2 menit. Selanjutnya, didinginkan dan setelah dingin dimasukkan sampel dalam sumur-sumur gel dengan volume 30  $\mu\text{L}$  untuk setiap sumur. Dimana salah satu sumuran gel diisi dengan protein standar marker. Berikutnya, dihubungkan anoda dengan reservoir bawah dan katoda dengan reservoir atas. Lalu dihubungkan power supply dengan sumber arus listrik dengan arus sebesar 30 mA 200 volt selama 1-2 jam. Dihentikan proses separatingnya jika warna penanda biru berada  $\pm$  0.5 cm dari batas bawah plat gel.

#### **3.4.9.3 Perlakuan Setelah Running**

Perlakukan 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.

#### **3.4.9.4 Penentuan Berat Molekul**

Penentuan berat molekul ini ditujukan untuk mengetahui protein-protein yang berada dalam ekstrak kasar 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

ekstrak kasar enzim tersebut. Berat molekul dapat diperoleh dengan mengukur mobilitas molekul protein dalam gel poliakrilamid berdasarkan kurva standar berat molekul dari protein standar. Berat molekul protein ditentukan dengan membandingkan mobilitasnya terhadap serangkaian standar protein yang berat molekulnya telah diketahui (Marker). Mobilitas (atau  $R_f$ ) diukur dengan memakai 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.

### 3.4.10 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  $10\text{ }\mu\text{m}$  untuk mempercepat pencapaian bidang potong jaringan. Lalu, jejunum dipotong dengan ukuran  $5\text{ }\mu\text{m}$ , diambil irisan dengan kuas dan dimasukkan air pada suhu ruang. Berikutnya, dipindahkan hasil irisan dengan kuas ke dalam air hangat  $38\text{-}40\text{ }^{\circ}\text{C}$  dan diambil irisan yang terentang sempurna dengan objek gelas. Irisan yang terpilih dikeringkan, diletakkan di atas *hot plate*  $38\text{-}40\text{ }^{\circ}\text{C}$  hingga kering dan setelah itu preparat disimpan dalam inkubator pada suhu  $38\text{-}40\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

### 3.4.11 Pewarnaan Hematoxylen-Eosin

Pewarnaan *Hematoxylen-Eosin* mula-mula dilakukan dengan tahapan deparafinasi, dimana preparat dimasukkan dalam *xylol* bertingkat masing-masing selama 5 menit. Berikutnya, dilakukan tahapan rehidrasi preparat dimana preparat dimasukkan dalam etanol bertingkat yang dimulai dari etanol absolut, etanol 95, 90, 80, dan 70

% masing-masing selama 5 menit. Lalu, direndam dalam akuades selama 5 menit. Setelah itu dilakukan tahapan pewarnaan. Dimana dimasukkan preparat dalam 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 akuades, dan dimasukkan dalam pewarna eosin alkohol selama 5 menit. Lalu, direndam preparat dalam akuades 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 entellan. Preparat yang telah diwarnai dianalisa menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 100x.

### 3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengukuran uji aktivitas maltase dianalisis dengan menggunakan oneway ANOVA dilanjutkan dengan pengujian beda nyata (BNT) sedangkan gambaran histologis dianalisis deskriptif.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan dalam empat tahap, yaitu perlakuan malnutrisi dan terapi glutamin, penentuan aktivitas ekstrak kasar maltase metode spektrofotometri menggunakan reagen Nelson-Somogyi, pewarnaan *Hematoxylen-Eosin* (HE), penentuan massa molekul relatif maltase dengan teknik SDS-PAGE.

#### 4.1 Perlakuan Malnutrisi

Tikus putih (*Rattus novergicus*) malnutrisi pada penelitian ini diberi diet rendah protein (*hipoprotein*) dan minuman secara *ad libitum*. Makanan yang mengandung protein 5% diberikan pada tikus untuk perlakuan malnutrisi, sesuai dengan hasil analisa makanan pada L.11. Pada penelitian ini perlakuan malnutrisi diidentifikasi dengan penurunan berat badan, penurunan berat limfa dan timus. Berdasarkan hasil penelitian, penurunan berat badan, kadar albumin, limfa dan timus ditunjukkan pada Tabel 4.1.

**Tabel 4.1 Rataan Parameter malnutrisi**

Parameter Malnutrisi	Perlakuan		
	Kontrol	Malnutrisi	Malnutrisi yang mendapat terapi glutamin
Peningkatan BB Tikus (%)	58,1058	9,3656	51,5061
Limfa (g)	0,8875	0,4676	0,6580
Timus (g)	0,6715	0,2692	0,4511
Kadar Albumin (mg/dL)	3,48	2,16	3,26

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa pada tikus malnutrisi terjadi penurunan berat badan, berat limfa dan timus, serta kadar albumin. Namun setelah mendapat terapi glutamin terjadi peningkatan kembali pada parameter malnutrisi. Malnutrisi menyebabkan penurunan limfa dan timus karena berkurangnya protein yang dapat membentuk sistem imun (Santos, *et al*,1997). Menurut Hidajat, *dkk* (2007)

malnutrisi menyebabkan menurunnya albumin yang merupakan indikator rusaknya protein dalam tubuh. Kadar albumin normal sebesar 2,5-3,8 (mg/dL), pada Tabel 4.1 menunjukkan perbedaan antara ketiga perlakuan, kadar albumin tikus malnutrisi lebih kecil dari pada kadar albumin normal. Hal ini menunjukkan bahwa tikus perlakuan pada penelitian mengalami malnutrisi.

Terapi glutamin terhadap tikus malnutrisi dilakukan dengan dosis 300 mg/kg BB tikus/hari selama 15 hari. Glutamin diberikan dengan dosis 300 mg/kg BB tikus, dilarutkan dalam 2 mL aquades, seperti yang tercantum dalam L.2.1. Pemberian glutamin ke dalam tubuh tikus putih dilakukan secara oral, yaitu dengan menggunakan alat *gavage* yang langsung menuju bagian lambung (*gastro*) tikus melalui mulut seperti pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Terapi glutamin secara oral pada tikus

Glutamin dipilih karena keadaan malnutrisi menyebabkan glutamin dalam tubuh berkurang, walaupun tubuh dapat memproduksi glutamin sendiri. Pada keadaan malnutrisi, glutamin yang tersedia dalam tubuh tidak mencukupi untuk kebutuhan metabolisme tubuh, sehingga diperlukan asupan dari luar untuk memenuhi kebutuhan dalam tubuh. Berdasarkan akvititas maltase yang dapat dilihat pada Tabel 4.2, glutamin dapat meningkatkan aktivitas maltase sebesar 31,03%.

#### 4.2 Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Maltase

Aktivitas maltase pada penelitian ini diperoleh dari isolasi jejunum tikus kontrol, malnutrisi dan malnutrisi yang mendapat terapi glutamin. Aktivitas ekstrak kasar maltase dinyatakan dalam

satuan Unit (U), dimana satu unit aktivitas ekstrak kasar maltase menunjukkan banyaknya  $\mu$ mol maltosa yang dihasilkan oleh reaksi hidrolisis setiap mililiter (mL) maltase per menit pada kondisi optimumnya (pH 6,5, temperatur 37°C, waktu inkubasi 15 menit) (Ranuh *et.al.*,2008).

Berdasarkan hasil penelitian, penentuan aktivitas ekstrak kasar maltase yang ditentukan dengan menggunakan rumus penentuan aktivitas enzim (L.6.3). Hasil penentuan aktivitas ekstrak kasar maltase dari 3 macam perlakuan tikus yang diperoleh, dapat dilihat perbedaan aktivitas antara ke tiga perlakuan pada Tabel 4.2.

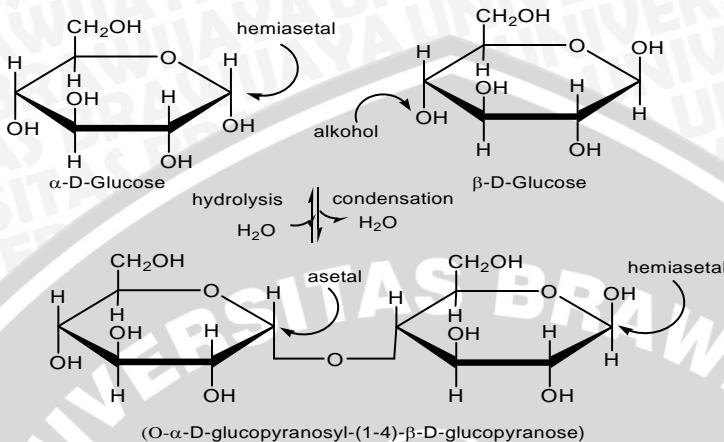
**Tabel 4.2. Rataan aktivitas maltase hasil isolasi dari jejunum tikus**

Perlakuan	Rataan Aktivitas ( $\mu$ mol/mL.menit)	Notasi BNT*
Kontrol	2,9011± 0,0035	a
Malnutrisi	2,0826± 0,0712	b
Malnutrisi yang mendapat terapi glutamin	3,0196± 0,0116	a

\* Notasi dengan huruf yang berbeda menunjukkan adanya sangat nyata  $p > 0,01$ .

Penentuan aktivitas ekstrak kasar maltase dilakukan menggunakan reagen Nelson-Somogyi secara spektrofotometri. Panjang gelombang maksimum gula pereduksi yang didapatkan dari hidrolisis maltosa, yaitu 747 nm. Kemudian harga absorbansi yang diperoleh diplotkan ke dalam persamaan  $y = 0,223x$  pada kurva baku glukosa (L.5.1).

Hidrolisis maltosa yang dikatalisis oleh maltase menghasilkan 2 mol glukosa, dimana monosakarida yang terbentuk merupakan gula pereduksi yang dapat bereaksi dengan reagen Nelson-Somogyi untuk membentuk kompleks Molibdenum biru. Kadar gula pereduksi yang terbentuk dapat diketahui dengan mengukur absorbansi dari kompleks Molibdenum biru pada panjang gelombangnya. Aktivitas maltase ditunjukkan oleh banyaknya glukosa yang terbentuk pada saat reaksi hidrolisis maltase seperti pada Gambar 4.2.



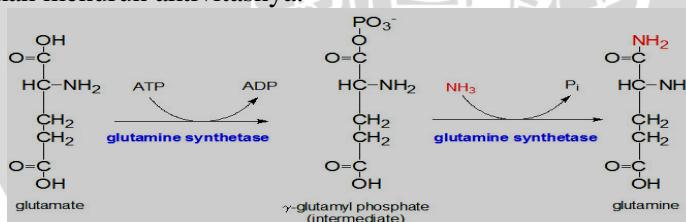
Gambar 4.2.1 Reaksi hidrolisis Maltosa dengan Maltase sebagai katalis  
(Murray, et.al, 1993)

Tabel 4.2 menunjukkan terjadinya penurunan aktivitas maltase untuk tikus yang mengalami malnutrisi dibandingkan dengan tikus yang tidak mengalami malnutrisi dan tikus malnutrisi yang telah diterapi. Nilai aktivitas rata-rata ekstrak kasar maltase hasil isolasi dari jejunum tikus yang mengalami malnutrisi adalah  $2,0826 \pm 0,0712$  Unit, sedangkan nilai aktivitas rata-rata ekstrak kasar maltase hasil isolasi dari jejunum tikus yang tidak mengalami malnutrisi (kontrol) adalah  $2,9011 \pm 0,0035$  Unit dan nilai aktivitas rata-rata ekstrak kasar maltase hasil isolasi dari jejunum tikus malnutrisi yang telah mendapatkan terapi adalah  $3,0196 \pm 0,0116$  Unit. Berdasarkan hasil perhitungan yang tercantum pada L.6.3, aktivitas rata-rata ekstrak kasar maltase hasil isolasi dari jejunum tikus yang mengalami malnutrisi dengan tikus yang tidak mengalami malnutrisi (kontrol) mengalami penurunan sebesar 28,21 %.

Perbedaan aktivitas maltase ini dianalisa menggunakan ANOVA, menggunakan uji F (L.7). Dimana dari uji F diperoleh harga  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$  ( $F_{\text{hitung}} = 599,6153$ ;  $F_{\text{tabel}} = 6.93$ ) dengan taraf nyata =0,01, yang menunjukkan bahwa pemberian terapi glutamin mempunyai pengaruh yang nyata terhadap perlakuan penelitian. Selanjutnya aktivitas tersebut diuji dengan BNT 1% untuk melihat perbedaan antara perlakuan data seperti pada Tabel 4.2 Nilai uji statistika tersebut, menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak kasar maltase pada tikus yang mengalami malnutrisi berbeda nyata dengan

aktivitas ekstrak kasar maltase pada tikus yang tidak mengalami malnutrisi (kontrol) dan aktivitas ekstrak kasar maltase pada tikus malnutrisi yang mendapatkan terapi. Sehingga dapat disimpulkan bahwa perlakuan terapi glutamin yang diberikan berpengaruh pada aktivitas ekstrak kasar maltase hasil isolasi dari jejunum tikus, yaitu meningkatnya kembali aktivitas maltase.

Penurunan aktivitas maltase ini disebabkan karena rusaknya mukosa yang diakibatkan berkurangnya asupan nutrisi (malnutrisi) yang diperlukan untuk poliferasi sel-sel pembentuk mukosa usus. Dalam keadaan malnutrisi terjadi ketidakseimbangan nitrogen atau kesetimbangan nitrogen dalam tubuh negatif. Hal ini disebabkan karena sintesis protein < katabolisme protein. Protein yang berasal dari makanan dicerna oleh lambung dengan HCl dan enzim pepsin sebagai katalis yang bekerja pada pH optimumnya menjadi dipeptida, kemudian dipeptida diuraikan oleh dipeptidase menjadi asam amino. Apabila sintesis protein dalam tubuh sedikit maka protein yang didegradasi menjadi asam amino juga sedikit. Metabolisme asam amino dalam tubuh ada 2, yaitu anabolisme dan katabolisme. Dalam keadaan malnutrisi sintesis protein dalam tubuh lebih kecil daripada katabolisme protein, sehingga anabolisme asam amino juga akan terhambat. Glutamin merupakan asam amino yang menjadi bahan bakar utama untuk pembentukan sel-sel mukosa usus. Namun pada keadaan malnutrisi glutamin yang dihasilkan tidak mencukupi untuk kebutuhan metabolisme. Apabila glutamin yang dihasilkan tidak mencukupi, maka proses poliferasi sel-sel mukosa usus tidak akan terjadi sehingga mukosa usus akan rusak dan enzim disakarida yang ada akan menurun aktivitasnya.



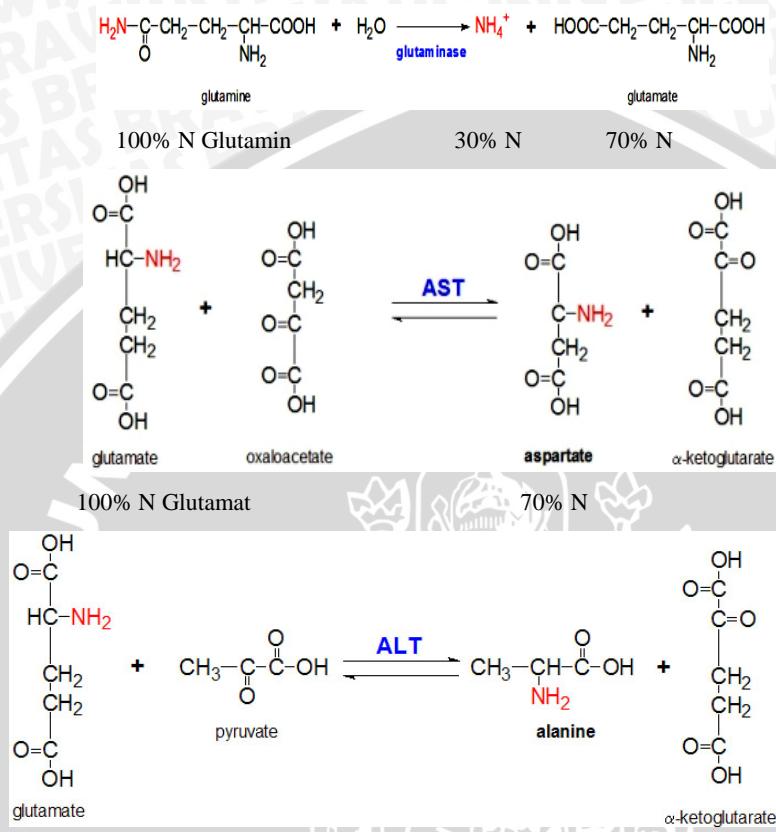
Gambar 4.2.2 Proses Pembentukan Glutamin

Glutamin merupakan asam amino non essensial yang dapat disintesis sendiri oleh tubuh. Namun, dalam keadaan malnutrisi terjadi ketidakseimbangan nitrogen (keseimbangan nitrogen negatif), yaitu sintesis protein < katabolismenya yang menyebabkan proses

metabolisme asam amino terganggu. Sehingga diperlukan asupan glutamin dari luar untuk memenuhi kebutuhan nitrogen dalam tubuh. Menurut Tannus, et al. (2005), glutamin mempunyai dua gugus nitrogen,yaitu amida dan amina, yang sangat penting untuk transport nitrogen antar jaringan dan untuk transport ammonia dari bagian luar sampai bagian dalam organ.

Dengan dua nitrogen yang dimiliki glutamin, glutamin menjadi pentranspor nitrogen yang merupakan energi utama metabolisme asam-asam amino lain yang membentuk sel-sel mukosa usus. Sehingga terapi glutamin dapat meningkatkan maltase yang merupakan salah satu enzim yang terdapat dalam mukosa usus. Menurut Nesholme, et.al. (1995), siklus metabolisme glutamin pada sel-sel mukosa (Gambar 4.2.3 ). Produk akhir dari metabolisme glutamin pada sel mukosa adalah glutamat, aspartat dan ammonia ditunjukkan oleh Gambar 4.2.4. Amonia diproduksi oleh sekitar 30 % nitrogen dari glutamin, dengan bantuan glutaminase, glutamin dapat menghasilkan amonia, seperti halnya glutamat yang diproduksi oleh glutamin melalui reaksi transaminasi dengan glutamat dehidrogenase. Pada metabolisme glutamin menjadi glutamat, 70% yang dapat diubah menjadi aspartat yang akan digunakan untuk membentuk limfosit. Sisanya 30% diubah menjadi alanin yang akan digunakan untuk membentuk enterosit. Metabolisme ini dibantu oleh aspartat aminotransferase dan alanin amino transferase. Limfosit dan enterosit ini merupakan sel-sel penyusun dari mukosa usus.

Gambar 4.2.3 Metabolisme Glutamin  
(Newsholme, *et. al.*, 1995)



#### Gambar 4.2.4 Proses degradasi glutamin (King, 2009)

#### **4.3 Pengaruh malnutrisi tehadap histologi jejunum tikus dengan pewarnaan *Hematoxylen-Eosin* (HE)**

Kerusakan sel pada jejunum tikus akibat malnutrisi dapat diketahui melalui metode pewarnaan *Hematoxylen-Eosin* (HE) organ jejunum. Hasil pewarnaan organ jejunum menggunakan metode pewarnaan HE menunjukkan adanya perbedaan gambaran sel mukosa jejunum tikus dengan beberapa perlakuan yaitu antara sel dari tikus kontrol, sel dari tikus yang mengalami malnutrisi, dan sel tikus terapi glutamin. Perbedaan ini dapat dilihat pada Gambar 4.3.



(a) gambar histologi organ jejunum tikus kontrol



(b) gambar histologi organ jejunum tikus malnutrisi



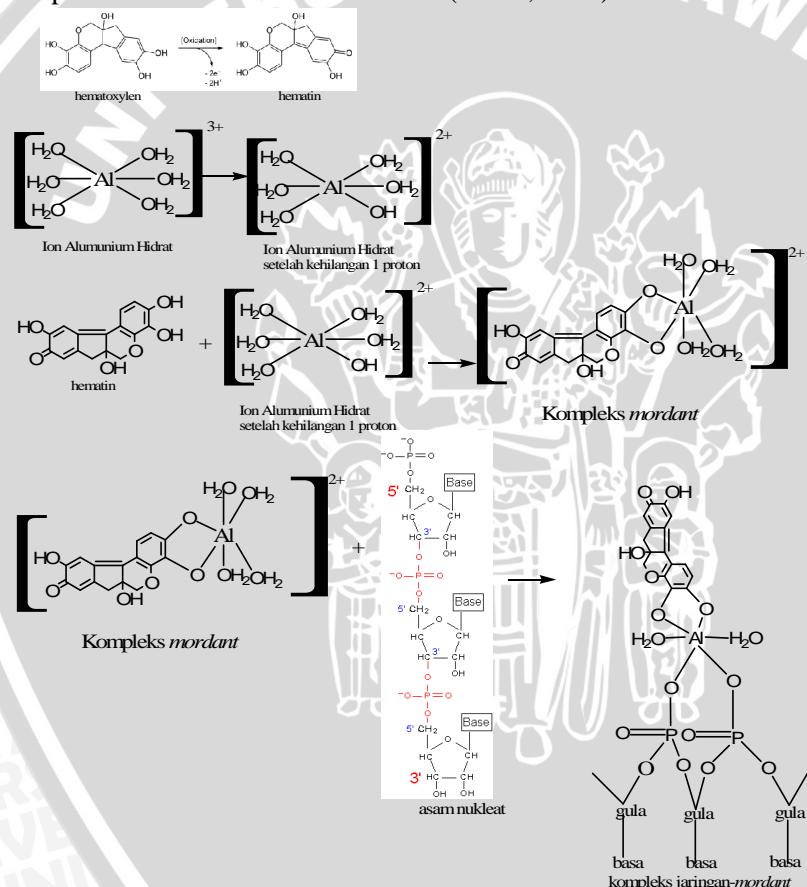
(c) gambar histologi organ jejunum tikus terapi

Gambar 4.3.1 Hasil pewarnaan HE pada Organ Jejenum Tikus (pembesaran 100x)

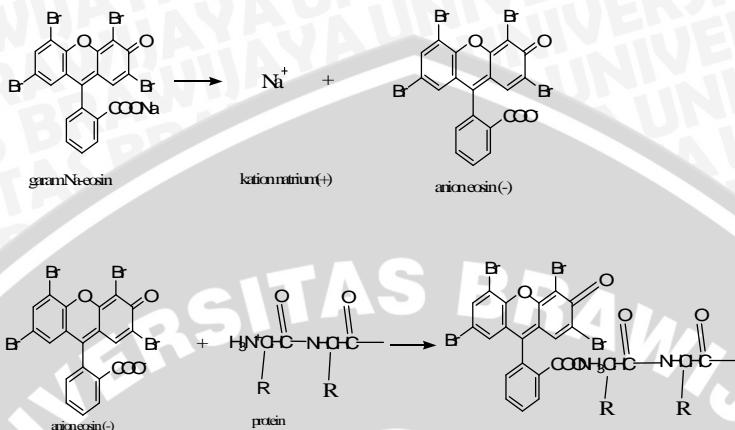
Menurut Suntoro (1983) metode pewarnaan HE merupakan metode rangkap yang memakai dua macam zat warna, yaitu *Hematoxylen* dan *Eosin*. Metode ini umumnya digunakan untuk mewarnai jaringan atau organ yang membutuhkan kontras antara sitoplasma dengan inti. *Hematoxylen* sebagai zat warna yang bersifat 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.

Dalam pewarnaan Hematoxylen-Eosin, Hematoxylen teroksidasi menjadi hematein yang mengikat garam Al dalam bentuk ion Aluminium hidrat membentuk kompleks mordant. Kompleks mordant sebagai kation yang akan mengikat komponen anion (gugus fosfat asam nukleat) dari jaringan khususnya inti (nucleus) membentuk warna biru keunguan. Sedangkan Eosin berfungsi sebagai anion yang mengikat kation (terminal N) residu asam amino dari protein membentuk warna merah (Baker, 1960).



Gambar 4.3.2 Proses Pewarnaan Hematoxylen pada inti (nucleus)



Gambar 4.3.2 Proses Pewarnaan Eosin pada sitoplasma

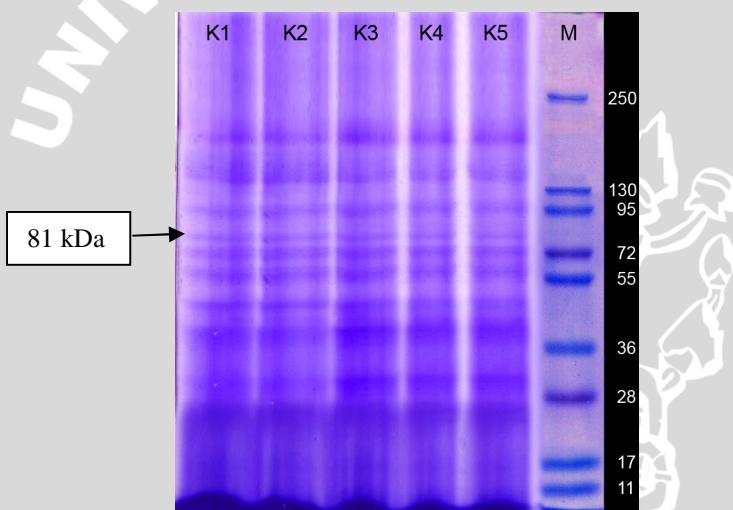
Gambar (b) menunjukkan bahwa kondisi malnutrisi dapat merusak jaringan jejunum tikus, terutama pada lapisan mukosa dari jejunum. Pada tikus kontrol Gambar (a), terlihat bahwa sel-sel mukosa dari jejunum tikus berada dalam kondisi yang baik dan sempurna. Dimana sel-sel mukosanya terlihat membentuk lonjong dan bagian ujungnya tumpul, serta lebih rapat. Sedangkan pada tikus yang mengalami malnutrisi Gambar (b), sel-sel mukosanya terlihat rusak yang ditunjukkan dari hilangnya beberapa bagian dari sel mukosa yang tidak tersusun rapat. Sedangkan pada tikus yang mendapatkan terapi sel-sel mukosa usus tampak hampir sama dengan tikus kontrol, yaitu bentuk lonjong dan bagian ujung tumpul dan lebih rapat dibandingkan pada tikus malnutrisi.

Kerusakan sel-sel mukosa yang ditunjukkan pada Gambar (b), disebabkan oleh adanya proses perusakan jaringan jejunum karena tidak adanya poliferasi sel-sel yang menyusun mukosa usus. Hal ini dikarenakan berkurangnya ketersediaan protein yang mengakibatkan berkurangnya asam amino yang membentuk sel-sel penyusun mukosa usus. Pada Gambar (c) mukosa usus terlihat kembali dalam bentuk yang baik. Hal ini dikarenakan metabolisme glutamin yang dapat memperbaiki mukosa usus.

#### 4.4 Penentuan Massa Molekul relatif (Mr) Maltase

Massa molekul relatif dari maltase ditentukan dengan menggunakan teknik SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Profil protein dari ekstrak

kasar maltase yang telah ditentukan aktivitasnya dapat dilihat pada Gambar 4.4, 4.5, 4.6. Massa molekul relatif dari masing-masing pita proteininya ditentukan 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 massa molekul relatifnya dan dapat dihitung harga Rfnya, sehingga dapat diperoleh persamaan regresi linier kurva standar yang menghubungkan Rf (sumbu X) dan log Mr (sumbu Y). Untuk menentukan harga massa molekul relatif dari masing-masing pita protein, termasuk maltase (L.8), dapat dilakukan dengan memplotkan harga Rf yang telah diperoleh ke dalam persamaan  $y = -3,253x + 2,656$  pada kurva massa molekul relatif protein standar (L.8.1).



Gambar 4.4 Hasil running maltase pada tikus (*Rattus norvegicus*) kontrol

Ket:

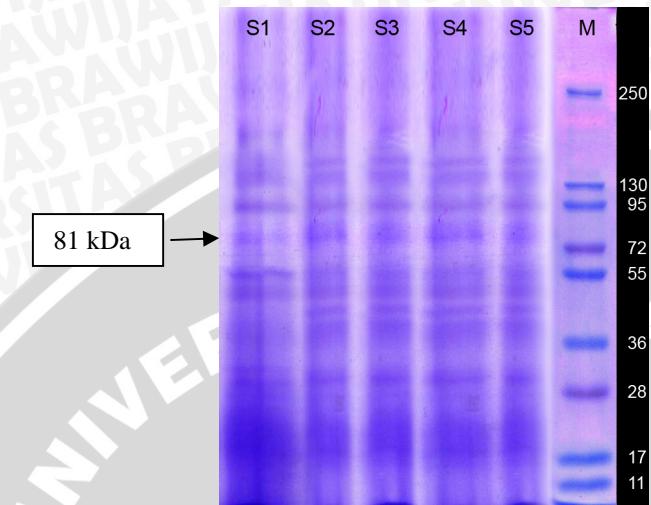
M = Marker

K = Tikus yang tidak mengalami malnutrisi (kontrol)

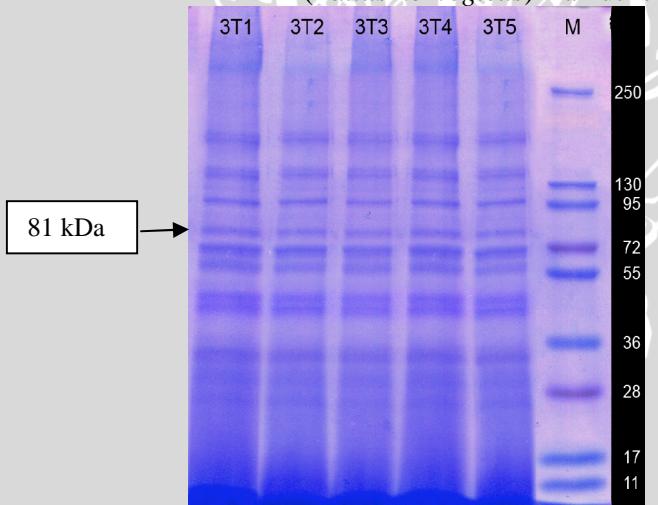
S = Tikus malnutrisi

3T = Tikus malnutrisi yang mendapatkan terapi glutamin  
300 mg/kg BB

→ = pita protein 81 kDa



Gambar 4.5 Hasil running maltase pada tikus (*Rattus norvegicus*) malnutrisi



Gambar 4.6 Hasil running maltase pada tikus (*Rattus norvegicus*) terapi glutamin

Gambar 4.4, 4.5, 4.6 menunjukkan bahwa pada masing-masing ekstrak kasar maltase mengandung beragam jenis protein dengan massa molekul relatif seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.4

**Tabel 4.4 Perbedaan Massa Molekul Relatif (Mr) Protein pada setiap Ekstrak Kasar Maltase**

Perlakuan	Mr protein (kDa) gel elektroforesis												
	23	27	33	41	46	52	65	72	81	95	129	136	171
K <sub>1</sub>	V	V		V	V	V	V	V	V	V	V		V
K <sub>2</sub>	V	V		V	V	V	V	V	V	V	V		V
K <sub>3</sub>	V	V		V	V	V	V	V	V	V	V		V
K <sub>4</sub>	V	V		V	V	V	V	V	V	V	V		V
K <sub>5</sub>	V	V		V	V	V	V	V	V	V	V		V
S <sub>1</sub>		V		V	V	V			V	V	V	V	
S <sub>2</sub>		V		V	V	V			V	V	V	V	
S <sub>3</sub>		V		V	V	V			V	V	V	V	
S <sub>4</sub>		V		V	V	V			V	V	V	V	
S <sub>5</sub>		V		V	V	V			V	V	V	V	
3T <sub>1</sub>	V	V	V		V	V	V	V	V	V	V		V
3T <sub>2</sub>	V	V	V		V	V	V	V	V	V	V		V
3T <sub>3</sub>	V	V	V		V	V	V	V	V	V	V		V
3T <sub>4</sub>	V	V	V		V	V	V	V	V	V	V		V
3T <sub>5</sub>	V	V	V		V	V	V	V	V	V	V		V

Tabel 4.4. menunjukkan bahwa adanya perbedaan profil protein antara ketiga kelompok perlakuan. Menurut Jacob et al.(1999), maltase hasil isolasi dari usus mempunyai Massa molekul relatif 81 kDa. Berdasarkan hasil SDS-PAGE Gambar 4.4, 4.5,4.6 dan Tabel 4.4 Massa molekul relatif 81 kDa masih ditemukan pada ketiga kelompok perlakuan. Namun aktivitas maltase dari ketiga perlakuan tersebut berbeda sangat nyata (Tabel 4.2). Hal ini diyakini bahwa turunnya aktivitas maltase pada tikus malnutrisi disebabkan karena berkurangnya substrat maltosa pada kondisi tersebut. Substrat maltosa berkurang karena rusaknya jejunum tikus yang mengalami malnutrisi.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1. Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Terapi glutamin terbukti dapat meningkatkan aktivitas maltase hasil isolasi dari jejunum tikus putih (*Rattus novergicus*) malnutrisi sebesar 31,03%.
2. Glutamin dapat memperbaiki histologi jejunum tikus putih (*rattus novergicus*) yang telah rusak akibat malnutrisi yang ditunjukkan oleh perbaikan sel-sel mukosa pada jejunum.

#### **5.2 Saran**

Pada penelitian lebih lanjut, perlu dipelajari aktivitas maltase hasil isolasi protein dari jaringan lain. Selain itu perlu dikaji lebih jauh terhadap protein dengan massa molekul relatif 33 kDa dan 136 kDa pada kondisi malnutrisi dan terapi glutamin.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aiache, J.M., J. Ph. Devissaguet, M.M. Guyot-Hermann, 1993, **Farmasetika 2 : Biofarmasi**, Airlangga University Press, Surabaya
- Aritonanga, E. 2004, **Kurang Energi Protein (Protein Energy Malnutrition)**,  
<http://library.usu.ac.id/download/fkm/fkmgizi-evawany.pdf>, diakses tanggal 3 September 2008
- Armitage, David, 2004, *Rattus norvegicus*, Animal Diversity Web, University of Michigan of Zoology
- Barbara, A, 2001, **The Role Of Glutamine In Oncology Therapy**,  
[http:// Med.Sci. Sports Exerc.net/html / 00987.html](http://Med.Sci. Sports Exerc.net/html / 00987.html), diakses tanggal 20 Januari 2009
- Baker, J.R, 1960, **Experiment on Action of Mordant**, Quarterly Journal of Microscopical Science, Vol 101, part 3, pp 255-272
- Convia, M., 2005, **Glutamine**, <http://www.invista.com/nutrition.htm>, diakses tanggal 17 September 2008
- Corey, B., 2008, **The Role Of Glutamine**, <http:// Sports Remo.net/html / 04925.html>, diakses tanggal 16 Januari 2009
- Fergus M.C., 1995, **Food Nutrition and Health**, The A VI Publishing Company inc, WeSport, Connecticut Stone
- Garret, R.H. and Charles, M.G. 1995. **Biochemistry**. Saunders College Publishing. USA.
- Hebel, R. and Stromberg, M.W., 1996, **Anatomy of the Laboratory Rat**, The Williams & Wilkins Company, Baltimore
- Hendrotomo, dr., dan dr. Muhardi, 1993, **Pemberian Nutrisi Parenteral pada Penderita Gangguan Pencernaan**, Cermin Dunia Kedokteran No. 16
- Hidajat, B., Roedi I., Siti N.H. 2007, **Kurang Energi Protein**. <http://www.emedicine.com/derm/topic797.htm>, diakses tanggal 3 September 2008

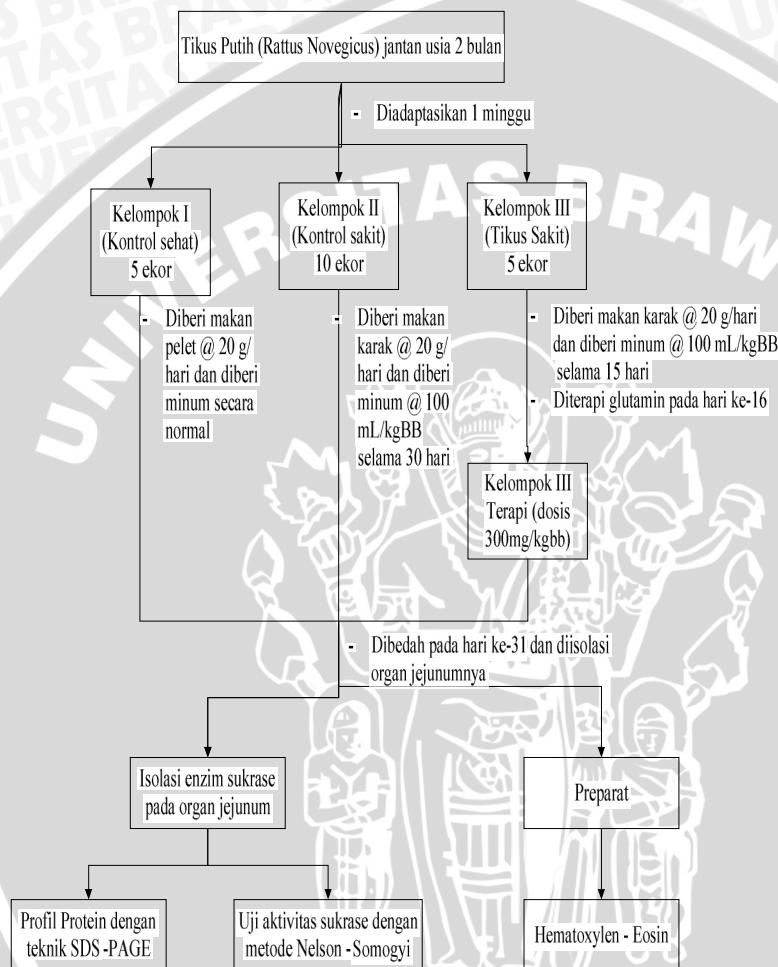
- Hugo, 2003, **Glutamine**, <http://www.mediterian/diet/776s.htm>, diakses tanggal 3 Januari 2009
- Islam, S., Amal, K.M, Ashish, K.C dan Nur, H.A, 2006, **Intestinal Enzymes during Malnutrition & Infection in Rabbits**, *Indian J Med Res* 124, September 2006, pp 313-318
- Israr, Y. A., 2008, **Malnutrisi Energi Protein (MEP) – Kwashiorkor**, <http://yayanakhyan.wordpress.com/malnutrisi/>, diakses tanggal 17 Desember 2008
- Jacob, Roberto Q, Bruce, R., Gary, D.199. **Contribution of Mucosal Maltase-Glucoamylase Activities to Mouse Small Intestinal Starch-Glucogenesis1–3**, Institute of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Berne, Berne CH-3012, Switzerland
- King, M.W, 2009, **Introduction to Amino Acid Metabolism**, <http://www.IU School of Medicine / miking at iupui.edu>, diakses tanggal 4 Juni 2009
- 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
- Lee, E. A., Stacey L. W., Mandy L., Rosa T., and Jared D., 1998, **A Method for Assaying Intestinal Brush-Border Sucrase in An Intact Intestinal Preparation**, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA Vol. 95, pp. 2111–2116
- Lehninger, A.L. 1997. **Dasar-Dasar Biokimia Jilid I**. Alih Bahasa : Maggy Thenawidjaya. Erlangga. Jakarta
- Loren, K., 2008, **The Role Of L-Glutamin**, <http://www.chelationtherapyonline.com/articles/p69.htm>, diakses tanggal 20 Desember 2008
- Mokoagow, M. I., 2007, **Menilik Malnutrisi Dari Sisi Yang Berbeda**, <http://www.gizi.net/cgi-bin/berita/fullnews.cgi?newsid1129001012,53219>diakses tanggal 17 Desember 2008

- Montgomery, R., Robert, L. D., Thomas, W. C., Arthur, A. S., 1993,  
**Biokimia: Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus**, Gadjah  
mada University press, Yogyakarta
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW , 1993, **Harper's  
Biochemistry Twenty-Third Edition**. Appleton & Lange,  
Norwalk Connecticut
- Natali, M.R.M., Marcílio Hübner de M.N and Antônio M.O., 2000,  
**Effects of Hypoproteic Diet Supply on Adult Wistar Rats  
(Rattus norvegicus)**, *Acta Scientiarum* 22(2):567-571, ISSN  
1415-6814
- Neale, G., M.B., M. Clarkt., M.B., B. Levin,M.D., PH.D.,  
F.C.PATH., 1995, **Intestinal Maltase Deficiency  
Presenting as Maltase Intolerance in Adult Life**, *Brit.  
med. J.*, 1965, 2, 1223-1225
- Newsholme, E. A., Bernard Crabtree And M. Salleh Ardawij, 1995,  
**Review Article Glutamine Metabolism In Lymphocytes:  
Its Biochemical, Physiological And Clinical Importance**,  
*Quarterly Journal of Experimental Physiology* 70, 473-489
- Patel, D., 1994, **Gel Electrophoresis**, John Willey and Sons. Inc.,  
New York.
- 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
- 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
- Reinhard, T, 2002, **Gastrointestinal Disorders and Nutrition**.  
McGraw-Hill Companies, New York

- River, H., 2003, **Glutamine Basics**, <http://www.biology.arizona.edu>, diakses tanggal 30 November 2008
- Robyt dan White, 1991, **Biochemical Techniques Theory and Practise**. Brooks/Cole Publishing Company. California
- Soedarmadji, S., Haryono, N., Suhardi, 1997, **Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian**, Liberty, Yogyakarta, 34
- Sparkman, D.R., Ph.D., 1996, **Glutamine! Harness The Power**, <http://www.getbig.com/articles/glut-1.htm>, diakses tanggal 17 September 2008
- Tannuri, U, Francisco R.C., and Kiyoshi I., 2000, **The Effects of Glutamine-Supplemented Diet on the Intestinal Mucosa of the Malnourished Growing Rat**, *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo* 55 (3):87-92, 2000.
- Tannus, A.F. S., Márcia M.J-F., Vivian M.M.S., Guilherme V.P., and Júlio S.M., 2005, **Short Time L-Glutamine Supplementation of Malnourished Rats**, *Rev. Nutr. Campinas*, 18(6):719-725, nov./dez., 2005
- Vogel, A.I., 1994, **Text Book Of Macro And Semimicro Qualitative Inorganik Analysis**, 4th ed, Longmans, Green and Co Ltd, 214-242
- 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
- Waluyo, L. 2004. **Mikrobiologi Umum**. Penerbit Universitas Muhammadiyah. Malang
- Watson, R. R., 2008, **Biologi-Mulekul-Elektroforesis-Gel**, <http://onlinelearning media.com/2008/08/16/biologi-mulekul-elektroforesis-gel.htm>, diakses tanggal 20 Oktober 2008
- Wiwan, A., 2008, **Kasus Gizi Buruk Di Indonesia**, <http://sinarharapan.co.id/berita/0804/opi.html>, diakses tanggal 10 Desember 2008

## LAMPIRAN

### Lampiran 1 Skema Kerja Penelitian



## Lampiran 2 Preparasi Larutan

### L.2.1 Pembuatan larutan Glutamin Dosis 300 mg/kg BB

Pembuatan larutan glutamin dilakukan setiap hari. Langkah pertama yang harus dilakukan adalah menimbang glutamin. Misal berat badan tikus 169 g, maka glutamin yang ditimbang sebesar:

$$\text{Glutamin } 300 \text{ mg/kg BB} = \frac{300 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 169 \text{ g} \\ = 0,0507 \text{ gram}$$

Setelah glutamin ditimbang sebanyak 0,0507 gram kemudian dilarutkan dengan 2 ml akuades steril.

### L. 2.2 Pembuatan Larutan Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,4

Langkah pertama adalah ditimbang KCl sebanyak 0.1 gram, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 0.1 gram, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O sebanyak 1.08 gram, dan NaCl sebanyak 4 gram. Selanjutnya, bahan-bahan yang telah ditimbang dilarutkan dalam 250 mL akuades steril diaduk dengan stirer dan diatur pHnya hingga 7,4. Kemudian dipindahkan larutan ke dalam labu ukur 500 mL dan ditandabataskan dengan akuades.

### L.2.3 Pembuatan Larutan Paraformaldehid (PFA) 10%

Disiapkan larutan stok PFA 35%. Sehingga untuk membuat larutan PFA 10% diperlukan volume larutan stok PFA 3% sebesar :

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2 \\ 35\% \cdot V_1 = 10\% \cdot 250 \text{ mL} \\ V_1 = 71,43 \text{ mL}$$

Kemudian, dipipet larutan stok PFA 37% sebanyak 71.43mL dan dimasukkan dalam labu ukur 250 mL. Lalu ditandabataskan dengan menggunakan larutan NaCl-fis 0,9%.

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

Langkah pertama yang harus dilakukan adalah menimbang NaCl, dimana NaCl yang harus ditimbang adalah sebesar :

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

Setelah NaCl ditimbang sebanyak 4,5 gram kemudian dilarutkan dalam labu takar 500ml dengan akuades steril hingga tanda batas.

### L.2.5 Pembuatan Larutan Buffer Tris-Cl pH 6,8

Mula-mula yang harus dilakukan adalah menimbang Tris-HCl. Untuk membuat buffer Tris-Cl 0,02 M dengan Mr Tris-HCl = 157,56 g / mol, maka :

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

Sehingga untuk 200 mL, Tris-HCl yang diperlukan 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 Tris-HCl dan dilarutkan dalam akuades steril sebanyak 100 mL. Lalu, diatur pHnya hingga 6,8 dan ditambahkan kembali akuades steril hingga volumenya mencapai 200 mL.

### L.2.6 Pembuatan Larutan Glukosa Standar

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

#### a. Larutan glukosa 35 ppm

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 100 \text{ ppm} \cdot V_1 &= 35 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL} \\ V_1 &= 3,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

#### b. Larutan glukosa 30 ppm

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 100 \text{ ppm} \cdot V_1 &= 30 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL} \\ V_1 &= 3 \text{ mL} \end{aligned}$$

c. **Larutan glukosa 25 ppm**

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

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

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

d. **Larutan glukosa 20 ppm**

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

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

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

e. **Larutan glukosa 15 ppm**

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

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

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

f. **Larutan glukosa 10 ppm**

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

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

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

Kemudian, dipipet masing-masing volume larutan stok glukosa 100 ppm, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, dan ditandabataskan dengan akuades steril.

### **L.2.7 Pembuatan Air Bebas Reduktor**

Langkah pertama yang harus dilakukan adalah diambil 500 mL akuades, dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditambahkan  $\pm$  2 mL  $\text{KmnO}_4$  0,1 M hingga larutan berwarna merah muda. Kemudian didestilasi hingga terbentuk larutan yang tak berwarna kembali.

### **L.2.8 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 .  $4\text{H}_2\text{O}$ , 6,25 gram  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidrat, 5,00 gram  $\text{NaHCO}_3$ , dan 50,00 gram  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat. Lalu, dilarutkan dengan 100 mL akuades steril, dimasukkan dalam labu ukur 250 mL dan ditandabataskan dengan akaudes steril.

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. Lalu, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan

ditandabataskan dengan akuades steril. Kemudian ditambahkan 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 diaduk dengan pengaduk magnet. Pencampuran reagen Nelson A dan B dilakukan tepat saat akan digunakan.

### **L.2.9 Pembuatan Reagen Somogyi (arsenomolibdat)**

Mula-mula ditimbang 25 gram ammonium molibdat, dilarutkan dalam 450 mL akuades steril dan ditambahkan 25 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Kemudian pada tempat yang berbeda, ditimbang 3,00 gram NaHAsO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 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.2.10 Pembuatan Larutan APS (Amonium Persulfat) 10%**

Larutan APS 10% dibuat dengan ditimbang 0,5 gram ammonium persulfat dan dilarutkan dengan 5 mL akuades steril. Kemudian, dihomogenkan dengan vorteks serta disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

### **L.2.11 Pembuatan Larutan Poliakrilamida (T-Akril)**

Mula-mula ditimbang 2,92 gram akrilamida dan 0,0801 gram bisakrilamida, lalu dilarutkan dengan 7 mL akuades steril dengan diaduk dengan pengaduk magnet. Kemudian, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditandabataskan dengan akuades steril.

### **L.2.12 Pembuatan Larutan Upper Gel Buffer pH 6,8**

Ditimbang 0,75 gram Tris-base dan 0,0401 gram SDS, kemudian dilarutkan dengan 5 mL akuades steril. Lalu, diatur pHnya hingga 6,8. Kemudian, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditandabataskan dengan akuades steril.

### **L.2.13 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 akuades steril diaduk dengan pengaduk magnet serta diatur pHnya hingga 8,8. Kemudian, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditandabataskan dengan akuades steril.

### **L.2.14 Pembuatan Running Buffer**

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

### **L.2.15 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 -merkaptoetanol 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O	975
APS 10%	20
TEMED	2

### **L.2.17 Pembuatan Larutan Pewarna (Staining)**

Pertama-tama ditimbang 0,2501 gram Commassive 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.2.18 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 ditandabataskan dengan akuades steril.

### **L.2.19 Pembuatan Etanol Bertingkat**

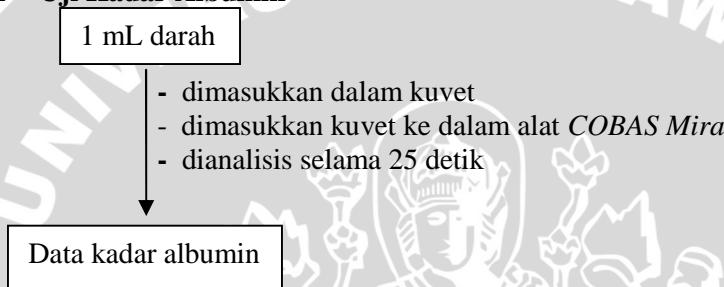
Larutan etanol bertingkat dibuat dari larutan etanol absolut 98%, yang kemudian diencerkan menjadi 95%, 90%, 80%, 70% dalam labu ukur 100 mL. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan akuades steril.

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

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

### Lampiran 3 Diagram Alir Penelitian

#### L.3.1 Uji Kadar Albumin



### L.3.2 Isolasi Enzim

Jaringan 0,5 g

- Digunting kecil-kecil
- Ditambah PBST-PSMF 4mM sebanyak 5X volume
- Ditambahkan sedikit pasir kuarsa
- Digerus dalam mortar dingin
- Dihomogenkan dengan vorteks 10 menit
- Dipecah dinding selnya dengan sonicator selama 10 menit
- Dilakukan sentrifugasi 6000rpm 15 menit

Supernatan

Endapan

- Ditambah etanol absolut dingin (1:1)
- Dimasukkan refrigerator selama semalam hingga terbentuk endapan
- Dilakukan sentrifugasi 10000 rpm 10 menit

- Dibuang

Endapan

Supernatan

- Dikeringkan hingga bau etanol hilang
- Ditambah buffer Tris-Cl 20 mM
- Disimpan pada suhu -20

- Dibuang

Crude enzim

### L.3.3 Uji Aktivitas Enzim Maltase

#### L.3.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan standart glukosa 35 ppm

- diambil sebanyak 1 mL
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan 1 mL air bebas reduktor
- ditambahkan 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)
- divorteks hingga endapan larut
- didiamkan selama 2 menit
- dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan air bebas reduktor sampai tanda batas
- diukur absorbansinya pada range 500-800 nm hingga diperoleh absorbansi maksimum

Data

### L.3.3.2 Pembuatan Kurva Baku Glukosa Metode Nelson-Somogyi

Larutan standart glukosa 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm

- diambil sebanyak 1 mL
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda
- ditambahkan 1 mL air bebas reduktor
- ditambahkan 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)
- divorteks hingga endapan larut
- didiamkan selama 2 menit
- dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan air bebas reduktor sampai tanda batas
- diukur absorbansinya pada maksimumnya

Data

### L.3.3.3 Penentuan Aktivitas Enzim Maltase

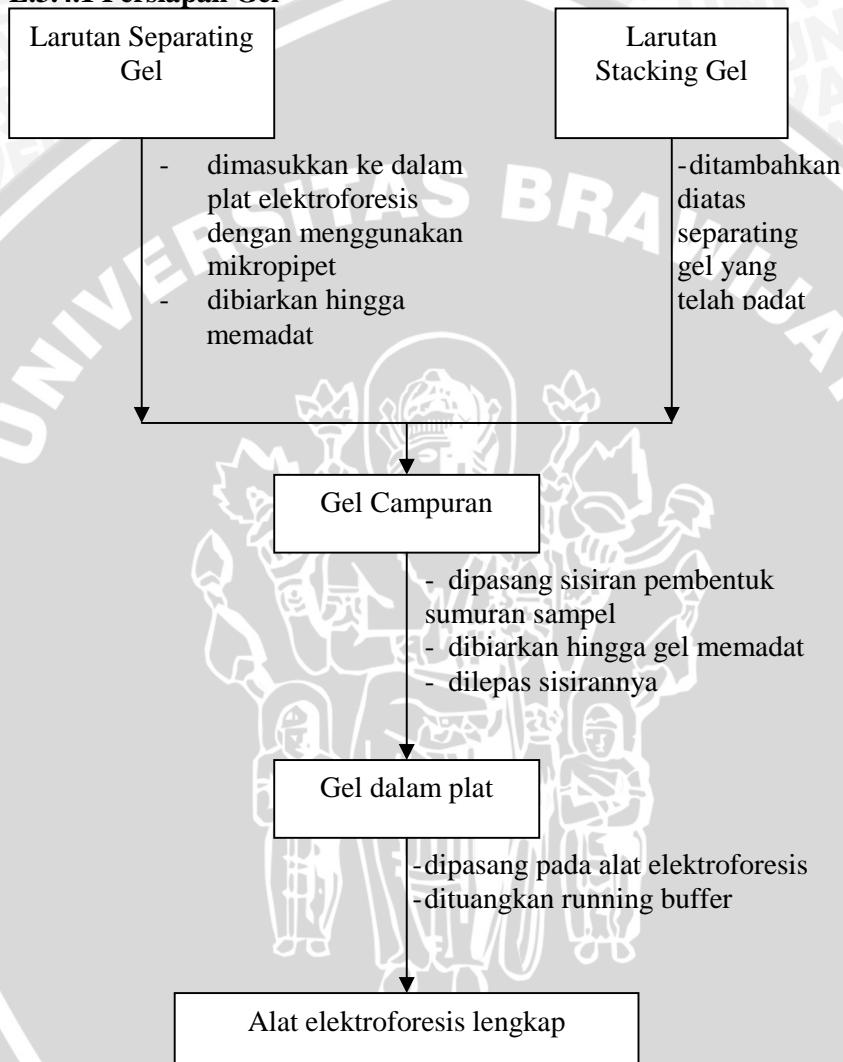
Crude enzim maltase

- diambil 40  $\mu\text{L}$
- ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  substrat maltosa 36 mM
- diinkubasi selama 15 menit pada 37°C
- ditambahkan 1 mL air bebas reduktor
- ditambahkan 1 mL 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 1 mL reagen Somogyi (arsenomolibdat)
- divorteks hingga endapan larut
- didiamkan selama 2 menit
- dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan air bebas reduktor sampai tanda batas
- diukur absorbansinya pada maksimumnya (747 nm)

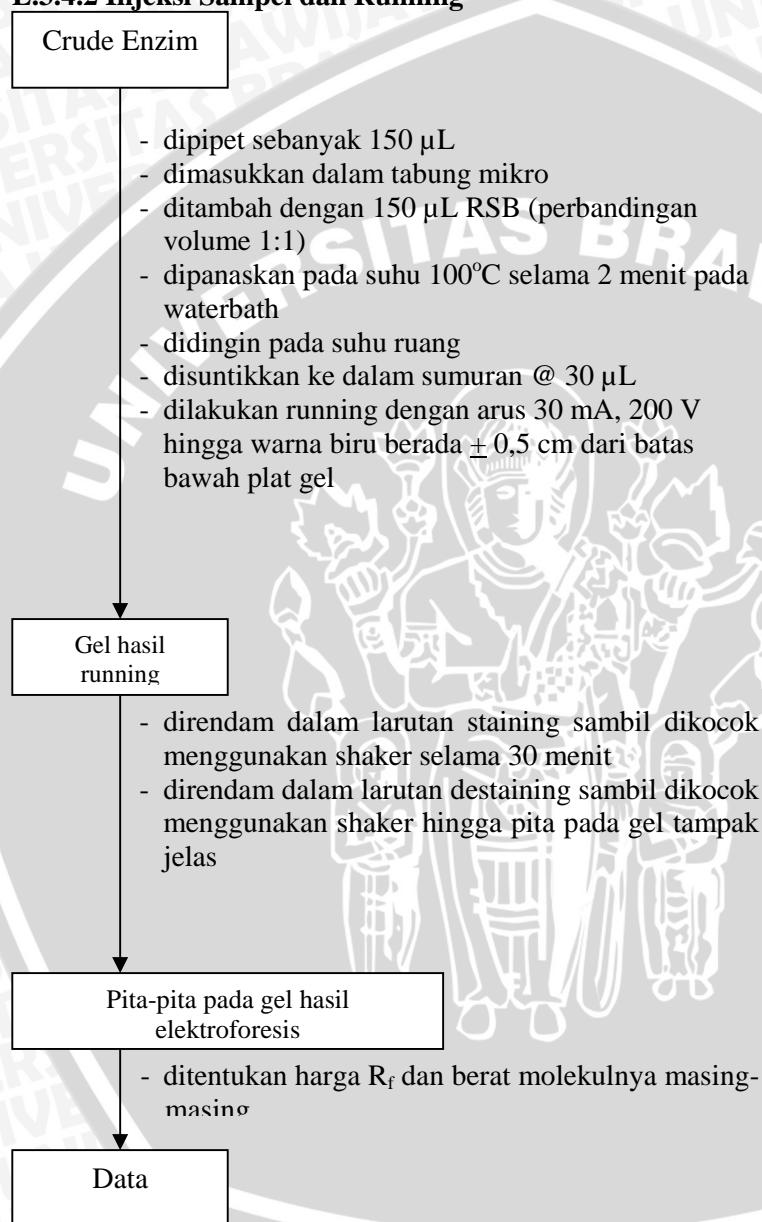
Data

## L.3.4 Profil Protein dengan Teknik SDS-PAGE

### L.3.4.1 Persiapan Gel



### L.3.4.2 Injeksi Sampel dan Running



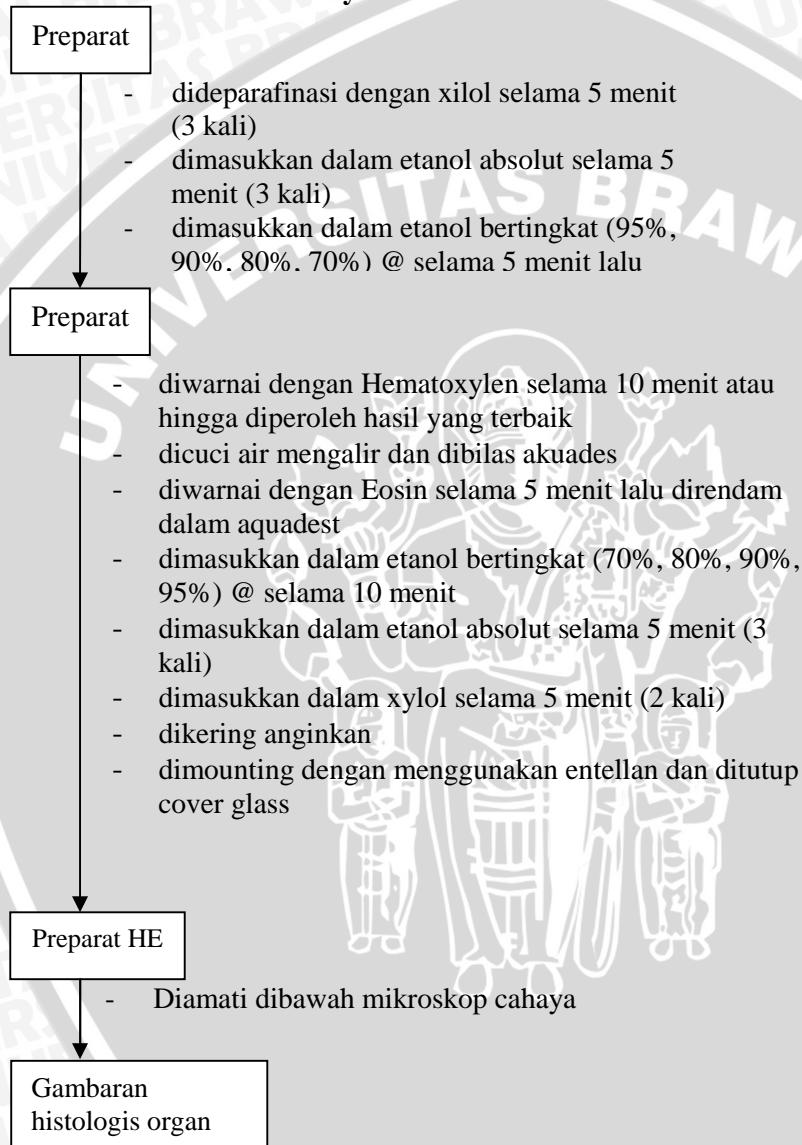
### L.3.5 Pembuatan Preparat Jejenum

Jejenum dalam blok  
parafin

- diiris seukuran  $5\text{ }\mu\text{m}$
- dimasukkan dalam air dingin pada suhu ruang
- dimasukkan dalam air hangat dengan suhu  $38\text{-}40^\circ\text{C}$
- diambil dengan objek glass
- dikeringkan di atas hot plate dengan suhu  $38\text{-}40^\circ\text{C}$
- diinkubasi pada suhu  $38\text{-}40^\circ\text{C}$  selama 24 jam

Preparat disimpan pada suhu ruang

### L.3.6 Pewarnaan Hematoxilen-Eosin



## Lampiran 4. Data Parameter Malnutrisi

### L.4.1.1 Data Limfa dan Timus

Tabel 4.1.1 Data Limfa dan Timus Tikus Kontrol

Kode Tikus	Berat limfa (gram)	Rata- rata	Berat timus (gram)	Rata- rata
K1	1.0585	0.8875	0.606	0.6715
K2	0.9567		0.5892	
K3	0.6183		0.604	
K4	1.0115		0.915	
K5	0.7925		0.6433	

Tabel 4.1.2 Data Limfa dan Timus Tikus Malnutrisi

Kode Tikus	Berat limfa (gram)	Rata- rata	Berat timus (gram)	Rata-rata
S1	0.4382	0.4676	0.1881	0.2692
S2	0.6161		0.4066	
S3	0.5045		0.2342	
S4	0.287		0.1852	
S5	0.4922		0.3321	

Tabel 4.1.3 Data Limfa dan Timus Tikus Terapi

Kode Tikus	Berat limfa (gram)	Rata-rata	Berat timus (gram)	Rata-rata
3T1	0.7991	0.6580	0.4871	0.4511
3T2	0.6718		0.4893	
3T3	0.7307		0.3217	
3T4	0.7156		0.5284	
3T5	0.3729		0.4288	

#### L.4.2 Data Kadar Albumin Dalam Darah

Tabel 4.2.1 Kadar Albumin Tikus Kontrol

Kode Tikus	Kadar albumin (mg/dL)	Rata-rata
K1	3.5	3.48
K2	3.4	
K3	3.4	
K4	3.5	
K5	3.6	

Tabel 4.2.2 Kadar Albumin Tikus Malnutrisi

Kode Tikus	Kadar albumin (mg/dL)	Rata-rata
S1	1.9	2.16
S2	2.2	
S3	2.4	
S4	2.2	
S5	2.1	

Tabel 4.2.3 Kadar Albumin Tikus Terapi

Kode Tikus	Kadar albumin (mg/dL)	Rata-rata
3T1	3.3	3.26
3T2	3.2	
3T3	3.4	
3T4	3.1	
3T5	3.3	

### L.4.3 Data Berat Badan Tikus

Tabel 4.3.1 Berat Badan Tikus Kontrol

Kode Tikus	Hari ke-(gram)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
K1	206	214	210	220	228	230	226	237	243	243
K2	208	215	219	226	227	232	232	231	237	235
K3	187	196	200	213	215	217	219	222	226	219
K4	179	188	194	190	195	195	208	212	211	218
K5	187	197	203	206	212	217	220	222	222	225
Kode Tikus	Hari ke-(gram)									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
K1	246	248	253	238	258	265	262	253	268	266
K2	236	238	239	245	249	250	252	233	247	254
K3	225	230	230	232	239	238	238	226	237	240
K4	212	221	222	224	230	234	233	231	240	243
K5	226	216	232	233	243	245	246	226	238	246
Kode Tikus	Hari ke-(gram)									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
K1	309	316	267	310	315	315	315	315	321	325
K2	256	262	270	312	316	310	315	315	324	328
K3	236	242	247	245	252	213	240	256	266	271
K4	244	248	252	257	263	260	260	266	274	277
K5	255	261	265	312	317	315	315	315	325	328

% Peningkatan BB tikus	Rata-rata
57.7670	58.1058
57.6923	
44.9198	
54.7486	
75.4011	

**Tabel 4.3.1 Berat Badan Tikus Sakit**

Kode Tikus	Hari ke-(gram)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S1	153	150	150	148	148	149	153	156	156	152
S2	165	164	168	167	169	167	175	174	179	177
S3	180	182	186	185	186	189	190	184	191	189
S4	174	174	168	169	165	170	171	172	177	183
S5	116	118	121	119	122	124	121	122	125	130
Kode Tikus	Hari ke-(gram)									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S1	155	159	165	165	165	169	171	176	175	169
S2	182	186	189	194	197	198	200	202	204	205
S3	191	197	200	202	205	204	204	200	201	195
S4	184	187	189	190	194	193	189	188	184	183
S5	135	138	140	144	145	149	148	147	143	147
Kode Tikus	Hari ke-(gram)									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
S1	167	165	167	167	167	168	163	168	165	165
S2	196	199	201	204	202	198	194	198	191	187
S3	203	201	205	200	200	203	202	200	192	191
S4	184	182	183	183	180	180	178	178	183	184
S5	143	140	140	142	143	138	135	134	136	132

% Peningkatan BB tikus	Rata-rata
7.8431	9.3656
13.3333	
6.1111	
5.7471	
13.7931	

**Tabel 4.3.1 Berat Badan Tikus Terapi**

Kode Tikus	Hari ke-(gram)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3T1	119	120	121	124	126	132	139	144	147	149
3T2	121	119	121	122	123	125	129	133	132	138
3T3	108	108	110	110	111	115	128	127	128	133
3T4	110	109	112	109	114	117	119	121	123	121
3T5	105	110	109	110	108	113	115	117	117	119
Kode Tikus	Hari ke-(gram)									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
3T1	154	153	161	169	170	169	174	175	175	174
3T2	136	137	137	139	144	138	141	140	144	139
3T3	133	137	138	144	143	142	142	142	146	144
3T4	121	127	130	132	135	138	136	137	139	141
3T5	119	121	121	119	120	118	121	118	125	128
Kode Tikus	Hari ke-(gram)									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
3T1	185	194	190	186	185	184	196	197	193	195
3T2	149	145	148	148	148	155	156	157	158	160
3T3	145	152	153	155	151	162	162	162	166	170

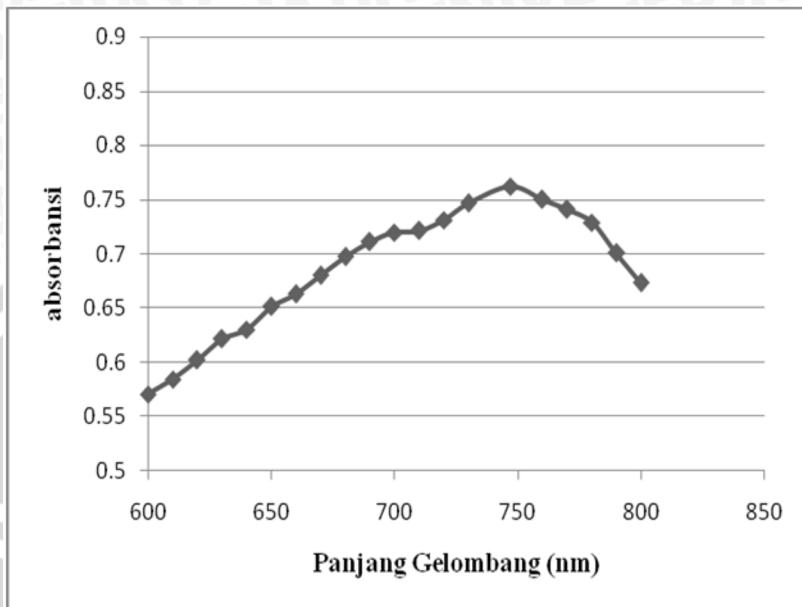
3T4	145	153	151	155	163	162	165	164	168	171
3T5	131	132	131	138	146	144	151	149	155	156

% Peningkatan BB tikus	Rata-rata
63.8655	
32.2314	
57.4074	
55.4545	
48.5714	51.5061

$$\% \text{ Peningkatan BB tikus} = \frac{\text{BB tikus hari ke-30} - \text{BB tikus hari ke-1}}{\text{BB tikus hari ke-1}}$$

**Lampiran 5. Penentuan Maksimum Larutan Glukosa  
Tabel L.5.1 Absorbansi Larutan Glukosa 3.5 ppm Pada Berbagai Panjang Gelombang**

(nm)	Absorbansi	(nm)	Absorbansi
600	0,5703	700	0,7198
610	0,5841	710	0,7212
620	0,6021	720	0,7314
630	0,6214	730	0,7466
640	0,6301	747	<b>0,7622</b>
650	0,6516	760	0,7503
660	0,6631	770	0,7411
670	0,6802	780	0,7289
680	0,697	790	0,7008
690	0,7109	800	0,6732

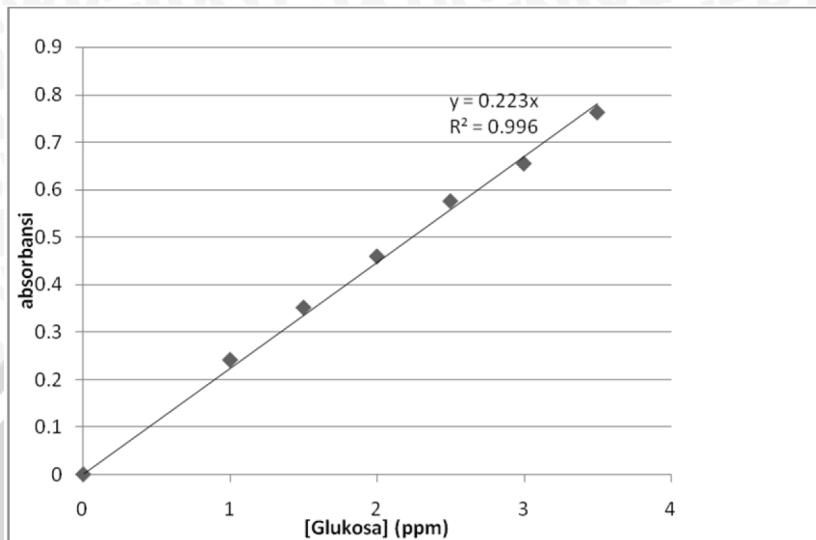


Gambar L.5.1 Kurva Serapan Larutan Glukosa 3.5 ppm

### Lampiran 6. Kurva Baku Larutan Glukosa

Tabel 6.1 Absorbansi Larutan Glukosa pada  $\lambda = 747 \text{ nm}$

[Glukosa] (ppm)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi rata-rata
0	0	0	0
1	0,2410	0,2408	0,2409
1,5	0,3512	0,3510	0,3511
2	0,4588	0,4590	0,4589
2,5	0,5755	0,6753	0,5754
3	0,6542	0,6544	0,6543
3,5	0,7621	0,7623	0,7622



Gambar.L.6.1 Kurva Baku Glukosa pada  $\lambda = 747 \text{ nm}$

### Lampiran 7. Aktivitas Maltase pada Ekstrak Kasar Maltase

Tabel L.7.1 Data Absorbansi Kompleks Molibdenum Biru

Sampel	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3	Absorbansi rata-rata
Kontrol 1	0,4444	0,4443	0,4446	0,4444
Kontrol 2	0,4461	0,4463	0,4460	0,4461
Kontrol 3	0,4453	0,4456	0,4455	0,4455
Kontrol 4	0,4457	0,4456	0,4456	0,4456
Kontrol 5	0,4455	0,4456	0,4453	0,4455
Sakit 1	0,3008	0,3009	0,3007	0,3008
Sakit 2	0,3338	0,3337	0,3339	0,3338
Sakit 3	0,3173	0,3175	0,3172	0,3173
Sakit 4	0,3256	0,3255	0,3251	0,3254
Sakit 5	0,3214	0,3215	0,3213	0,3214
Terapi	0,4559	0,4662	0,4661	0,4627

300mg (3T1)				
Terapi 300mg (3T2)	0,4669	0,4667	0,4667	0,4668
Terapi 300mg (3T3)	0,4614	0,4616	0,4617	0,4616
Terapi 300mg (3T4)	0,4642	0,4644	0,4640	0,4642
Terapi 300mg (3T5)	0,4628	0,4629	0,4629	0,4629

**Tabel L.7.2 Data Kadar Glukosa**

Sampel	Ulg	Abs	[2 mol glukosa] µg/mL	[glukosa] µg/mL
Kontrol	1	0,4444	1,9074	0,9965
	2	0,4461	1,9147	1,0003
	3	0,4455	1,9118	0,9988
	4	0,4456	1,9126	0,9992
	5	0,4455	1,9118	0,9988
Sakit	1	0,3008	1,2910	0,6744
	2	0,3338	1,4326	0,7484
	3	0,3173	1,3619	0,7115
	4	0,3254	1,3965	0,7296
	5	0,3214	1,3794	0,7206
Terapi 300mg	1	0,4627	1,9860	1,0375
	2	0,4668	2,0033	1,0466
	3	0,4616	1,9810	1,0349
	4	0,4642	1,9922	1,0408
	5	0,4629	1,9865	1,0378

**Contoh:** Perhitungan kadar glukosa dengan absorbansi kompleks Molibdenum biru 0,4444

$$Y = 0,223 X$$

$$0,4444 = 0,223 X$$

$$X = 1,9074 \text{ ppm}$$

$$X = [2 \text{ mol glukosa}] = 1,9074 \text{ ppm}$$

Nilai X merupakan besarnya kadar 2 mol glukosa, maka besarnya kadar glukosa ditentukan sebagai berikut :

$$[\text{glukosa}] = [2 \text{ mol glukosa}] \times \frac{1}{2}$$

$$= 1,9074 \times \frac{1}{2}$$

$$= 0,9965$$

**Tabel L.7.3 Aktivitas Maltase (pH 6,5, suhu 37 °C, waktu inkubasi 15 menit)**

Sampel	Ulg	[glukosa] μg/mL	Aktivitas μmol/mL. menit (U)	Aktivitas rata-rata μmol/mL. menit (U)
Kontrol	1	0,9965	2,8947	2,9011 ± 0,0035
	2	1,0003	2,9057	
	3	0,9988	2,9013	
	4	0,9992	2,9024	
	5	0,9988	2,9013	
Sakit	1	0,6744	1,9592	2,0826 ± 0,0712
	2	0,7484	2,1741	
	3	0,7115	2,0668	
	4	0,7296	2,1193	
	5	0,7206	2,0934	
Terapi 300mg	1	1,0375	3,0139	3,0196 ± 0,0116
	2	1,0466	3,0401	
	3	1,0349	3,0063	
	4	1,0408	3,0233	
	5	1,0378	3,0147	

## Persentasi Peningkatan Aktivitas Enzim Maltase Hasil Isolasi dari Jejunum Tikus

$$\% = \frac{\text{Aktivitas rata-rata maltase terapi} - \text{Aktivitas rata-rata tikus sakit}}{\text{Aktivitas rata-rata maltase terapi}}$$

$$\% = \frac{3,0196 - 2,0826}{3,0196} \times 100\%$$

$$\% = 31,03 \%$$

**Contoh:** Perhitungan aktivitas maltase pada ( pH 6,5; T 37°C; t = 15 menit) dengan kadar glukosa 1,9512 ppm

$$\begin{aligned} [\text{maltosa}] &= 0,9965 \text{ ppm} \\ &= 0,9965 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Sehingga untuk menentukan aktivitas maltase maka satuan glukosa dikonversikan menjadi  $\mu\text{mol/mL}$  dengan rumus :

Dimana:

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

p = Volume maltase (ml)

q = Waktu reaksi (menit)

fp = Faktor pengenceran = 100

Mr = Massa molekul relatif glukosa (180,157  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ )

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas} &= \frac{0,9965 \mu\text{g/mL} \times 3140 \cdot 10^{-3} \text{ mL} \times 100}{180,157 \mu\text{g}/\mu\text{mol} \times 40 \cdot 10^{-3} \text{ mL} \times 60 \text{ menit}} \\ &= 2,8947 \mu\text{mol/mL} \cdot \text{menit} \\ &= 2,8947 \text{ Unit} \end{aligned}$$

Satu unit aktivitas maltase dinyatakan dengan jumlah banyaknya  $\mu\text{mol}$  glukosa yang dihasilkan oleh reaksi hidrolisis laktosa (36 mM) setiap mililiter (mL) maltase pada suhu 37°C dan pH 6,5 untuk setiap menitnya.

### Lampiran 8. Data dan Uji Statistik Aktivitas Maltase

#### a. Penentuan Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left( \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2}{p \times n}$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{(2,8947 + \dots + 3,0147)^2}{3 \times 5} \\
 &= 106,7544
 \end{aligned}$$

### b. Penentuan Jumlah Kuadrat

#### 1. Jumlah Kuadrat Total (JKT)

$$\begin{aligned}
 JK_T &= \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}^2 - FK \\
 &= \{(2,8947)^2 + \dots + (3,0147)^2\} - 106,7544 \\
 &= 2,6297
 \end{aligned}$$

#### 2. Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)

$$\begin{aligned}
 JK_p &= \frac{\left( \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right) \right)^2}{n} - FK \\
 &= \frac{\{(14,5055)^2 + (10,4128)^2 + (15,0982)^2\}}{5} - 106,7544 \\
 &= 2,6037
 \end{aligned}$$

#### 3. Jumlah Kuadrat Galat (JKG)

$$\begin{aligned}
 JK_G &= JK_T - JK_p \\
 &= 2,6297 - 2,6037 \\
 &= 0,0261
 \end{aligned}$$

### c. Penentuan Kuadrat Tengah (KT)

#### 1. Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP)

$$\begin{aligned}
 KT_p &= \frac{JK_p}{dB_p} \\
 &= \frac{2,6037}{2} \\
 &= 1,3018
 \end{aligned}$$

#### 2. Kuadrat Tengah Galat (KTG)

$$\begin{aligned}
 KT_G &= \frac{JK_g}{dB_g} \\
 &= \frac{0,0261}{12} \\
 &= 0,0022
 \end{aligned}$$

#### d. Penentuan F Hitung

$$\begin{aligned} F_{\text{hitung}} &= \frac{KTP}{KTg} \\ &= \frac{1,3018}{0,0022} \\ &= 599,6153 \end{aligned}$$

Keterangan :

$Y_{ij}$  = Aktivitas maltase ( $\mu\text{mol/L}$ )

P = banyaknya perlakuan

n = banyaknya ulangan

**Tabel 8.1 Analisa Ragam Satu Arah Aktivitas Maltase**

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel 1%
Perlakuan	3	2,6037	1,3018	599,6153	6.93
Galat	12	0,0261	0,0022		
Total	15	2,6297			

Berdasarkan Tabel 7.1 terlihat bahwa Nilai  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ , hal ini menunjukkan bahwa pemberian terapi glutaminmempunyai pengaruh yang nyata terhadap kenaikan aktivitas maltase. Untuk mengetahui perlakuan mana saja yang mempunyai pengaruh berbeda maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf nyata 1%.

#### Uji BNT 1%

$$BNT( ) = t_{\text{tabel}} \left( \alpha/2, dBg \right) \sqrt{\frac{2 KTg}{n}}$$

$$\begin{aligned} BNT(0,01) &= t_{\text{tabel}} \left( \alpha/2, 12 \right) \sqrt{\frac{2 KTg}{n}} \\ &= 3,055 \sqrt{2(4,34 \times 10^{-3})} \\ &= 0,2013 \end{aligned}$$

Jika nilai uji BNT 1% lebih kecil atau sama dengan 0,2013, maka perlakuan tidak memberikan beda yang sangat nyata. Hal ini ditunjukkan dengan pemberian notasi yang sama. Jika hasil nilai uji BNT 1% memiliki nilai lebih besar dari 0,2013, maka perlakuan memberikan beda yang sangat nyata. Hal ini ditunjukkan dengan pemberian notasi yang sama.

**Tabel L.8.2 Hasil Uji BNT 1% Aktivitas maltase**

Rata-rata aktivitas		Kontrol	Sakit	Terapi
Kontrol	2,9011	0	0,8185*	0,1186
Sakit	2,0826		0	0,9371*
Terapi	3,0196			0

\*) = sangat berbeda nyata

**Tabel L.8.3 Notasi BNT 1% Terhadap Aktivitas Maltase**

Perlakuan	Rataan Aktivitas ( $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ )	Notasi
Kontrol	$2,9011 \pm 0,0035$	a
Sakit	$2,0826 \pm 0,0712$	b
Terapi	$3,0196 \pm 0,0116$	a

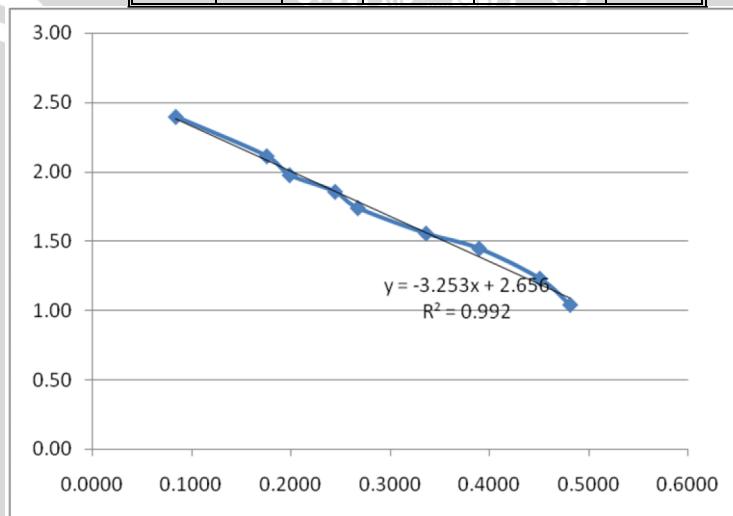
#### **Lampiran 9. Pembuatan Kurva Massa Molekul Relatif (Mr) Protein Standar**

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

$$R_f = \frac{\text{Jarak pergerakan sampel dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal}}$$

**Tabel L.9 Harga Rf dan Massa Molekul Relatif (Mr) Protein Standar**

Pita ke-1	a	b	Rf	Log BM	BM
1.	1.1	13.1	0.0840	2.40	250
2.	2.3	13.1	0.1756	2.11	130
3.	2.6	13.1	0.1985	1.98	95
4.	3.2	13.1	0.2443	1.86	72
5.	3.5	13.1	0.2672	1.74	55
6.	4.4	13.1	0.3359	1.56	36
7.	5.1	13.1	0.3893	1.45	28
8.	5.9	13.1	0.4504	1.23	17
9.	6.3	13.1	0.4809	1.04	11



Gambar L.9.1 Kurva Massa Molekul Relatif (Mr) Protein Standar

#### Lampiran 10. Penentuan Massa Molekul Relatif (Mr) Maltase dalam Ekstrak Kasar Maltase

Massa molekul relatif maltase dalam ekstrak kasarnya, ditentukan dengan mengeplotkan harga Rf dari masing-masing pita protein yang dihasilkan pada setiap sumuran dalam persamaan regresi linier yang diperoleh pada kurva massa molekul relatif

protein standar. Berikut ini contoh penentuan massa molekul relatif maltase pada ekstrak kasarnya:

**Misal:**

Jarak pergerakan protein dari tempat awal(a)

$$R_f = \frac{\text{Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal(b)}}{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal(a)}}$$
$$= \frac{3}{13}$$
$$= 0,2290$$

Kemudian, harga Rf diplotkan dalam persamaan :

$$y = ax + b$$

$$y = -3,253x + 2,656$$

$$= -3,253(0,2290) + 2,656$$

$$= 1,9110 (\log Mr)$$

Sehingga diperoleh massa molekul relatif maltase sebesar anti log 1,9110 = 81 kDa.

**Tabel L.10 Harga Massa Molekul Relatif (Mr) beberapa Pita Protein pada setiap Ekstrak Kasar Maltase**

Sampel	Pita ke-	a	b	Rf	Log Mr	Mr
Kontrol 1 (K <sub>1</sub> )	1	1.7	13.1	0.1298	2.2339	171
	2	2.2	13.1	0.1679	2.1097	129
Kontrol 2 (K <sub>2</sub> )	3	2.6	13.1	0.1985	2.0104	95
	4	3	13.1	0.2290	1.9110	81
Kontrol 3 (K <sub>3</sub> )	5	3.2	13.1	0.2443	1.8614	72
	6	3.4	13.1	0.2595	1.8117	65
Kontrol 4 (K <sub>4</sub> )	7	3.8	13.1	0.2901	1.7124	52
	8	4	13.1	0.3053	1.6627	46
Kontrol 5 (K <sub>5</sub> )	9	4.2	13.1	0.3206	1.6131	41
	10	4.9	13.1	0.3740	1.4392	27
	11	5.2	13.1	0.3969	1.3647	23
Sakit 1 (S <sub>1</sub> )	1	2.1	13.1	0.1603	2.1345	136
	2	2.2	13.1	0.1679	2.1097	129

Sakit 2 (S <sub>2</sub> )	3	2.6	13.1	0.1985	2.0104	95
	4	3	13.1	0.2290	1.9110	81
Sakit 3 (S <sub>3</sub> )	5	3.8	13.1	0.2901	1.7124	52
	6	4	13.1	0.3053	1.6627	46
Sakit 4 (S <sub>4</sub> )	7	4.2	13.1	0.3206	1.6131	41
	8	4.9	13.1	0.3740	1.4392	27
Sakit 5 (S <sub>5</sub> )						
Terapi 300mg (3T <sub>1</sub> )	1	1.7	13.1	0.1298	2.2339	171
	2	2.2	13.1	0.1679	2.1097	129
Terapi 300mg (3T <sub>2</sub> )	3	2.6	13.1	0.1985	2.0104	95
	4	3	13.1	0.2290	1.9110	81
Terapi 300mg (3T <sub>3</sub> )	5	3.2	13.1	0.2443	1.8614	72
	6	3.4	13.1	0.2595	1.8117	65
Terapi 300mg (3T <sub>4</sub> )	7	3.8	13.1	0.2901	1.7124	52
	8	4	13.1	0.3053	1.6627	46
Terapi 300mg (3T <sub>5</sub> )	9	4.6	13.1	0.3511	1.5137	33
	10	4.9	13.1	0.3740	1.4392	27
	11	5.2	13.1	0.3969	1.3647	23



UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS PETERNAKAN  
JURUSAN NUTRISI DAN MAKANAN TERNAK  
Jalan Veteran Malang 65145 Telp (0341) 575853  
E-mail : [nmfafanet@yahoo.com](mailto:nmfafanet@yahoo.com)

Nomor : 065/J.10.1.25.52/Lab-1/2009

Kepada : Yth. Sdr. Dr. drh. Aulanniam, DES  
Lab. Biokimia UB | Kepolisianan Statis Qabuq Qadisqah Acuqumah Statis  
Malang

Hasil analisis Laboratorium

## Itzū analisis Laboratorium

\*). Berdasarkan 100% Bahan kering

Malang, 16 Februari 2009

Mengetahui Malang, 16 Februari 2009  
Ketua Lab NMT

(tidak diperlukan)

 M. Habib Wasiq S. P. M.P.C.C.M. I.C.W.A. D.L.I.C. Dr. Ir. Mariuki, M.Sc.

NIP. 131 206 266 NIP. 131 839 355



KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
“ETHICAL CLEARENCE”

No: 29-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 : STUDI AKTIVITAS MALTASE HASIL ISOLASI DARI  
JEJUNUM TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)  
MALNUTRISI YANG MENDAPAT TERAPI GLUTAMIN

PENELITI : NURLEILA MAHARANI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : JURUSAN KIMIA F MIPA  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 24 Juni 2009

Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



PROF. DR. DRH. AULANNI'AM, DES.

NIP. 131 759 594