

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, seperangkat alat gelas (cawan petri, labu takar 10 mL dan 100 mL, pipet tetes, gelas ukur 10 mL, batang pengaduk, gelas arloji, gelas kimia 50 mL dan 100 mL, corong gelas), mikro pipet, mortar dan pestle, stirrer, botol semprot, vortex, tabung polipropilen, lemari pendingin, neraca analitik, seperangkat alat sentrifugasi, inkubator, spektrofotometri UV, autoclave, seperangkat alat elektroforesis, glucometer digital (Easy Touch GPU), GlucoDr™ test strip, *blood lancet*, *blood strip*, microtube, spuit, jarum sonde, *yellow tip* dan *blue tip*, masker, tisu, dan sarung tangan, dan *aluminium foil*.

3.1.2 Bahan

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yakni sampel rimpang pletekan (*Ruellia tuberosa*) yang diperoleh dari Materia Medika Batu, Malang, sampel hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*), *Streptozotocin* (STZ), betadin, alkohol 70%, larutan n-heksan, larutan baku tirosin 20 ppm, larutan kasein 500 ppm, larutan buffer fosfat pH 7, 0.1 M larutan buffer sitrat pH 4.5, larutan TCA 4% , *Upper Buffer*, T-Acryl, *Lower Gel Buffer* (LGB), akuades, *Ammonium Persulphate* (APS), *Tetramethyl Ethylene Diamine* (TEMED), larutan *Reducing Sample Buffer* (RSB), protein standar marker, larutan *staining*, larutan *destaining*, larutan NaCl-fisiologis 0.9%, larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*), dan pasir kuarsa.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Waktu penelitian berlangsung pada bulan Januari-Juni 2017.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu:

1. Persiapan hewan coba
2. Penentuan kadar glukosa darah dengan glukometer
3. Pembuatan larutan Streptozotocin (STZ) dan injeksi intraperitoneal (IP) pada hewan coba
4. Pembuatan ekstrak n-heksan rimpang pletekan dan penetapan dosis terapi
5. Terapi hewan coba dengan ekstrak n-heksan rimpang pletekan secara oral dan pengecekan glukosa darah
6. Pembedahan hewan coba dan isolasi organ hepar
7. Isolasi Protease
8. Pembuatan kurva baku tirosin
9. Pengukuran aktivitas protease
10. Persiapan gel elektroforesis SDS-PAGE
11. Injeksi sampel, *running* elektroforesis SDS-PAGE, dan proses pewarnaan
12. Penentuan berat molekul
13. Analisis data

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *wistar* jantan berusia ± 2 bulan diperoleh dari Biosains, Universitas Brawijaya. Tikus putih berjumlah 18 ekor dengan berat badan masing-masing ± 200 g. Penelitian ini terdiri dari 3 kelompok perlakuan, yaitu kelompok I tikus normal, kelompok II tikus (+) DM, kelompok III tikus (+) DM terapi dengan dosis terapi 250 mg/KgBB. Tiap kelompok terdiri dari 6 ekor tikus, hewan uji diaklimatisasi selama 2 minggu di Laboratorium Hewan Biosains.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak n-heksan Akar Pletekan dan Penetapan Dosis Terapi

Diambil akar pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) dalam keadaan masih segar, kemudian dicuci bersih dan dikering anginkan. Akar pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) kering sebanyak 1 kg kemudian

dihaluskan dengan *grinder* hingga diperoleh serbuk akar pletekan. Serbuk akar pletekan dimaserasi dengan pelarut n-heksan sebanyak 7,5 kali berat serbuk. Larutan maserasi diaduk tiap 1 jam di 5 jam pertama dan kemudian didiamkan hingga 48 jam. Ekstrak cair yang diperoleh didekantasi hingga terpisah dari serbuk pletekan. Ekstrak cair diuapkan dengan rotary evaporator pada temperatur 50°C, 90 rpm hingga diperoleh ekstrak. Ekstrak pekat dilarutkan dalam minyak jagung dan dimasukkan ke lambung tikus secara oral sebanyak 2 mL sesuai dengan ukuran maksimal lambung tikus. Dosis terapi yang digunakan adalah 250 mg/kgBB.

3.4.3 Pengukuran Kadar Glukosa Darah dengan Glukometer

Pengukuran kadar glukosa darah tikus dilakukan pada ketiga kelompok perlakuan. Pada kontrol negatif, pengukuran kadar glukosa dilakukan setelah aklimatisasi. Pada kelompok positif DM pengukuran kadar glukosa darah dilakukan saat sebelum injeksi STZ, dan setelah inkubasi. Pengukuran kadar glukosa pada kelompok terapi dilakukan saat sebelum injeksi STZ, setelah injeksi dan setelah terapi ekstrak. Mula-mula ujung ekor tikus diusapkan alkohol 75%, kemudian ditusuk dengan *blood lancet*. Darah tikus yang keluar kemudian dimasukkan kedalam ujung *blood strip* yang telah terhubung dengan glukometer dan dibaca kadar glukosa darah tikus.

3.4.4 Pembuatan Larutan STZ dan Injeksi Intraperitoneal pada Hewan Coba

Ditimbang 100 mg serbuk STZ menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dalam 3 mL buffer sitrat 0.1 M pH 4.5 dan di *vortex* hingga semua serbuk STZ larut. Larutan stok digunakan untuk injeksi dan disimpan dalam temperatur 4 °C.

Volume yang digunakan untuk injeksi disesuaikan dengan berat badan tikus. Dosis yang digunakan yakni 20 mg/kgBB yang diinjeksikan secara IP selama 5 hari berturut-turut. Tikus diposisikan menghadap ke arah frontal sehingga terlihat abdomennya. Pada bagian atas abdomen disemprot dengan alkohol 75%, lalu kulit dicubit hingga terasa bagian ototnya. Kemudian ditusukkan jarum suntik dan dicoba digerakkan, apabila terasa berat maka jarum suntik telah masuk pada area intraperitoneal. Selanjutnya dimasukkan STZ secara perlahan dan

abdomen tikus disemprot kembali dengan alkohol 75%. Tikus yang telah diinjeksi STZ diinkubasi selama 14 hari dan dilakukan pengecekan kadar gula darah setiap 7 hari sekali untuk mengetahui kondisi glukosa darah tikus. Tikus dikatakan positif DM apabila glukosa darah melebihi 200 mg/dL [12].

3.4.5 Terapi Hewan Coba dengan Ekstrak n-heksan Rimpang Pletakan secara Oral

Dilakukan terapi dengan ekstrak n-heksan pada tikus kelompok (+) DM terapi dengan dosis yang digunakan adalah 250 mg/kgBB. Ekstrak pekat dilarutkan dalam minyak jagung, banyaknya (mg) ekstrak yang diambil didasarkan pada berat badan tikus masing-masing. Terapi dilakukan 1 x 2 mL sehari selama 21 hari secara oral. Dilakukan pengecekan kadar glukosa darah dengan glukometer setiap 7 hari sekali.

3.4.6 Pembedahan Hewan Coba dan Isolasi Organ Hepar

Mula-mula tikus diletakkan diatas nampan bedah dan ditata pada posisi ventral diatas, lalu dilakukan dislokasi leher. Kemudian tikus dibedah dan diambil organ-organ serta darahnya dengan bantuan skalpel dan alat bedah lain. Organ yang telah diambil dicuci dengan larutan NaCl fisiologis 0.9% dan disimpan dalam larutan PBS azida dalam lemari es.

3.4.7 Isolasi Protease

Ditimbang 0.3 g organ hepar dengan neraca analitik, kemudian diletakkan di atas mortar dingin dan ditambahkan sedikit pasir kuarsa lalu digerus hingga halus. Setelah itu ditambahkan larutan PBS Tween:PMSF (9:1) sebanyak 5x volume sampel dan digerus kembali. Kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikrotub dan disonikasi selama 10 menit. Setelah itu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Lalu, supernatan diambil dan ditambah dengan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada temperatur 4 °C dan diambil endapan yang terbentuk. Endapan dikeringkan hingga bau etanol hilang. Selanjutnya endapan ditambahkan larutan buffer Tris-

HCl pH 6.5 dingin dengan perbandingan volume 1:1 lalu dilakukan homogenasi.

3.4.8 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Dalam pembuatan kurva baku tirosin, pertama disiapkan 10 labu ukur dan masing-masing diisi larutan baku tirosin dengan konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, dan 20 ppm. Kemudian ditambah akuades hingga tanda batas dan dikocok. Setelah itu diukur absorbansinya pada masing-masing konsentrasi larutan baku pada panjang gelombang maksimum 275 nm. Blanko yang digunakan adalah aquades.

3.4.9 Pengukuran Aktivitas Protease

Langkah pertama yang dilakukan adalah mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 100 μ L, 150 μ L larutan buffer fosfat pH 0,1, dan 50 μ L enzim protease lalu diinkubasi selama 60 menit pada temperatur 37 $^{\circ}$ C. Setelah itu ditambahkan 200 μ L larutan TCA 4% dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur 27 $^{\circ}$ C (temperatur ruang). Selanjutnya, disentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan kemudian diambil 200 μ L dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya pada λ maks tirosin sebesar 275 nm, untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim. Pengukuran aktivitas enzim protease didasarkan pada metode Walter (1984) dengan rumus:

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

Dimana: v = volume total sampel (mL)
q = waktu inkubasi
fp = faktor pengenceran
p = jumlah enzim

3.4.10 Persiapan Gel Elektroforesis SDS-PAGE

Langkah pertama yang dilakukan yaitu membuat plat gel dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat kurang lebih 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat sampel (*Stacking*

gel) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*Separating gel*). Pembuatan *stacking gel* dilakukan dengan melarutkan *Upper Gel Buffer*, T-Acryl, APS, dan TEMED menjadi satu dalam akuades, sedangkan pembuatan *separating gel* dibuat dengan melarutkan *Lower Gel Buffer* (LGB), T-Acryl, akuades, *ammonium persulphate* (APS), dan *tetramethyl ethylene diamine* (TEMED) menjadi satu. Kemudian campuran larutan *separating gel* tersebut dimasukkan ke dalam tempat lapisan gel menggunakan mikropipet dan dibiarkan selama 10-30 menit hingga terbentuk gel.

Selanjutnya, *stacking gel* dituang diatas *separating gel* yang telah memadat sambil memasang sisir hingga terbentuk gel dan sumurnya. Apabila telah terbentuk gel, maka sisir diangkat dengan hati-hati dan plat dipasang pada alat elektroforesis. Kemudian larutan *running buffer* dituangkan ke dalam bejana elektroforesis.

3.4.11 Injeksi Sampel, *Running*, dan Proses Pewarnaan

Diambil 15 μL ekstrak kasar hasil isolasi hepar. Kemudian ditambahkan 15 μL *reducing sample buffer* (RSB), dan dipanaskan pada penangas air selama 3 menit dengan temperatur 100 °C lalu didinginkan. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel dengan volume 9 μL pada tiap sumur, namun pada salah satu sumur diisi dengan protein standar marker. Setelah itu, anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan pada reservoir atas lalu keduanya dihubungkan pada *power supply* dengan arus listrik sebesar 30 mA dan tegangan sebesar 150 V. Apabila posisi marker berada pada jarak kurang lebih 0,5 cm dari batas bawah plat gel, maka proses ini dapat dihentikan. Setelah proses *running* selesai maka dilakukan pewarnaan dengan merendam gel dalam larutan *staining* selama 30-60 menit sambil dikocok menggunakan *shaker*. Selanjutnya, larutan *staining* diganti dengan larutan *destaining* untuk merendam dan dikocok menggunakan *shaker* hingga gel jernih.

3.4.12 Penentuan Berat Molekul

Untuk mengetahui jenis-jenis protein pada hasil isolasi sampel maka dapat dilakukan dengan membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan marker protein. Selanjutnya dihitung

nilai Rf dari masing-masing pita untuk menentukan berat molekul protein dengan perhitungan sebagai berikut:

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

Setelah itu dibuat kurva standar dengan harga Rf sebagai sumbu x dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu y, lalu dibentuk plot mobilitas dan berat molekul dari protein yang akan dicari sehingga diketahui berat molekulnya.

3.4.13 Analisis Data

Data analisis yang diperoleh dari pengukuran kadar glukosa dan uji aktivitas enzim protease dianalisis menggunakan Analisis Ragam *One Way* ANOVA dan uji lanjutan BNJ dengan $\alpha = 0,05$, sedangkan data analisis yang diperoleh dari SDS PAGE dianalisis dengan analisa deskriptif [34].