

## BAB III METODOLOGI

### 3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan suatu penelitian eksperimental *in vivo*

### 3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler serta Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penelitian berlangsung selama 1 tahun.

### 3.3 Sampel

Penelitian dilakukan terhadap tikus putih jantan galur Wistar berumur  $\pm 4$  bulan dengan berat badan 150-200 gram. Tikus dibagi ke dalam 4 kelompok:

Kelompok kontrol adalah kelompok tikus yang hanya diberi akuades.

Kelompok BM (buah merah) adalah kelompok tikus yang diberi minyak buah merah.

Kelompok FAA adalah kelompok tikus yang diinduksi 2 FAA.

Kelompok BM + FAA adalah kelompok tikus yang diberi minyak buah merah dan diinduksi FAA.

Semua tikus diberi diet standar, akuades dan bahan uji melalui sonde lambung. Jumlah sampel dan ulangan ditentukan berdasarkan rumus Federer seperti berikut:

$$\{(t-1)(n-1)\} \geq 15, t = \text{jumlah perlakuan dan } n = \text{jumlah ulangan}$$

Berdasarkan rumus diatas apabila jumlah kelompok perlakuan ( $t$ ) = 4 maka didapatkan  $n = 6$ , dengan demikian jumlah sampel adalah 24. Perlakuan dilakukan sesuai dengan skema berikut

Tabel 2. Desain penelitian

Kelompok Perlakuan	Minggu											
	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Kontrol												
BM		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FAA		■										
BM+FAA		■										

Keterangan

Akua

Pemberian FAA 40 µg/hari

Pemberian minyak buah merah 10µL/gram BB/hari

Pemberian minyak buah merah 5 µL/gram BB/hari selama 3 hari

Pemberian minyak buah merah 10µL/gram BB/hari disertai pemberian FAA 40 µg/hari

↓ = tikus dikorbankan

### 3.4 Bahan dan cara

#### 3.4.1 Pemeliharaan hewan percobaan

##### Bahan dan alat:

Tikus jantan galur Wistar, pakan, asam pikrat, kandang tikus, serutan kayu dan timbangan.

##### Cara kerja:

Tikus-tikus dipelihara di dalam kandang yang masing-masing mewakili 4 kelompok yaitu: Kontrol, BM, FAA dan BM + FAA. Guna membedakan kelompok perlakuan maka tikus diberi tanda pada bulunya dengan menggunakan asam pikrat. Kandang dialas dengan serbuk kayu untuk menyerap kotoran. Alas kandang diganti 2 kali seminggu. Kandang ditempatkan dalam ruangan yang memiliki ventilasi yang cukup dengan suhu ruangan sekitar 20 C. Makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum*, ditambah dan diperiksa setiap hari. Penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap minggu.

##### Pemberian minyak buah merah

##### Bahan dan alat:

Minyak buah merah dibeli dari perusahaan penghasil minyak buah merah (CV. Papua Cendrawasih Industries) yang sudah mendapatkan izin dari Departemen Kesehatan RI (P.IRT. No: 214911202004) dan sonde lambung.

##### Cara Kerja:

Dosis buah merah yang digunakan berdasarkan dosis yang dianjurkan oleh produsen buah merah untuk pengobatan kanker, yang didapatkan secara empiris yaitu 3 kali 1 sendok makan per hari. Berdasarkan asumsi bahwa ukuran 1 sendok makan yang biasa digunakan masyarakat adalah 10 ml, maka dosis harian adalah  $3 \times 10 \text{ ml} = 30 \text{ ml}$ . Apabila berat badan rata-rata dianggap 50 kg maka dosis/kg berat badan/ hari adalah  $30/60 = 0,5 \text{ ml/kg berat badan/hari}$ .

Dosis ini kemudian dikonversikan ke tikus dengan cara dikalikan 20 sehingga didapatkan bahwa dosis/kg berat badan tikus/hari adalah  $0.5 \times 20 = 10$  ml/kg berat badan/Hari atau 10 ul/gram berat badan/hari. Apabila berat badan tikus adalah 200 gram maka dosis yang diberikan adalah 2 ml.

Pemberian minyak buah merah dengan dosis 10  $\mu$ L/g BB berat badan/hari pada kelompok BM+FAA dimulai seminggu sebelum pemberian FAA sebagai perlindungan. Sebelumnya pada dua kelompok BM dan BM+FAA pada awal perlakuan diberikan minyak buah merah 1 ml/hari selama 3 hari untuk adaptasi. Sementara itu pada kedua kelompok yang lain diberikan akuades dengan jumlah dan waktu yang disesuaikan sebagai persamaan perlakuan.

### **Induksi karsinogenesis dengan N2- fluoroenilasetamida (FAA)**

#### **Bahan dan alat:**

N2-fluoroenilasetamida (FAA)(Sigma), akuades dan sonde lambung.

#### **Cara kerja:**

Larutan FAA dibuat dengan kadar 40  $\mu$ g/ml sebanyak 1000 ml. Larutan tersebut dibuat dengan cara menambahkan akuades ke dalam 4 ml larutan FAA (1 g/100 ml alkohol) sampai volume 1000 ml. Tikus- tikus kelompok FAA dan BM+FAA diberi FAA dengan kadar 40  $\mu$ g/ml menggunakan sonde lambung sejumlah 1 ml/hari selama jangka waktu 8 minggu<sup>61</sup>.

#### **Pengambilan darah dari jantung dan hati**

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan sampel yang berasal dari darah dan hati. Hal ini disebabkan hati merupakan target utama dari FAA dan proses kerusakan yang berlangsung di jaringan hati maupun di jaringan lain akan tercermin di dalam darah.

#### **Bahan dan alat:**

Larutan eter, formalin 10%, NaCl 0,9%, Dapar Tris HCL pH 7,5, gliserol, sukrosa, merkaptoetanol, bejana kaca untuk membius tikus, *minor set*, tabung EDTA, alat sentrifus, pot plastik, pipet dan *homogenizer*.

#### **Cara Kerja:**

Pengambilan darah jantung dan hati tikus dilakukan pada akhir minggu ke 8. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus dianestesi terlebih dahulu menggunakan eter dengan cara dimasukkan ke dalam bejana yang sudah dijenuhi oleh uap eter. Rongga dada dibuka dan darah jantung diambil dengan menggunakan pipet. Darah ditampung dengan tabung EDTA.

Hati tikus dibebaskan dari jaringan penggantungnya, selanjutnya diangkat. Untuk preparat histopatologis dilakukan pengambilan irisan hati dengan ukuran 0,75 X 0,75 cm pada bagian tengah lobus anterior kiri dan kanan. Potongan hati kemudian ditampung dengan pot plastik yang berisi dapar formalin. Hati yang tersisa selanjutnya dimasukkan ke dalam wadah yang berisi NaCl 0,9% untuk dibuat homogenat. Darah diputar menggunakan alat sentrifus dengan kecepatan 3000 RPM. Plasma dipisahkan untuk disimpan pada suhu -20 °C sampai dilakukan pemeriksaan. Untuk pemeriksaan proteasom, sebelum disimpan, ke dalam darah ditambahkan gliserol (kadar akhir 50%). Jaringan hati sisa dikeluarkan dari NaCl 0,9% dan dikeringkan menggunakan kertas saring, kemudian dilakukan penimbangan dan berat hati dicatat. Pembuatan homogenat dibagi 2 yaitu: homogenat untuk pemeriksaan proteasom dan homogenat untuk pemeriksaan asam sialat. Homogenat pemeriksaan proteasom dibuat dengan cara melumatkan jaringan hati dengan penambahan larutan dapar Tris-HCL 50 mM, pH 7,5, 1 mM merkaptoetanol, 0,25 M sukrosa sehingga diperoleh homogenat 10 %. Homogenat selanjutnya disentrifugasi pada 20.000 g selama 1 jam dengan temperatur 4 °C. Ke dalam supernatan yang diperoleh kemudian ditambahkan gliserol (konsentrasi akhir 50%), selanjutnya dapat disimpan pada -20 °C sampai saat dilakukan pemeriksaan.

Pembuatan homogenat hati untuk pemeriksaan asam sialat bersamaan dengan pembuatan hidrolisat plasma. Hal ini akan dibicarakan secara khusus pada cara kerja asam sialat.

### **Pemeriksaan asam sialat**

#### **Pemeriksaan asam sialat plasma**

Pemeriksaan asam sialat dilakukan dengan cara Warren<sup>62</sup> yang sudah dimodifikasi<sup>13</sup>.

#### **Bahan dan alat:**

Larutan asam trikloroasetat 10%, larutan asam sulfat 0,2 N dan 0,1 N larutan Na periodat 0,2 M dalam asam fosfat 9 M, larutan Na sulfat 0,5 M dalam asam sulfat 0,1 N yang mengandung Na arsenit 10%, larutan asam Tiobarbiturat dalam Na sulfat 0,5 M dan sikloheksanon.

#### **Cara Kerja:**

##### **Pembuatan hidrolisat plasma**

Plasma sejumlah 15 µL diencerkan dengan air suling 500 µL.

Larutan diendapkan menggunakan TCA 10% sebanyak 1000 µL

Larutan kemudian disentrifugasi pada 3000 RPM selama 10 menit, selanjutnya supernatan dibuang

Presipitat kemudian dicuci dengan TCA 10% sebanyak 1000  $\mu\text{L}$

Presipitat disentrifugasi kembali selama 10 menit, supernatan lalu dibuang

Presipitat ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  HCL 0,1N sebanyak 500  $\mu\text{L}$ , kemudian dipanaskan dalam penangas air pada suhu 80°C selama 1 jam.

Sentrifugasi dilakukan kembali selama 10 menit pada 3000 RPM untuk memisahkan endapan, selanjutnya larutan siap untuk diperiksa.

Pemeriksaan spektrum absorpsi

150  $\mu\text{L}$  larutan standar asam sialat direaksikan dengan 150  $\mu\text{L}$  larutan Na metaperiodat 0,2 M.

Larutan dikocok kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu kamar

Ditambahkan Na arsenit 10% sebanyak 1 ml, dan dikocok sampai warna kuning/coklat hilang.

Ditambahkan TBA 0,6% sebanyak 3 ml, lalu dikocok dengan baik.

Tabung ditutup dengan kelereng, dipanaskan dengan penangas air mendidih selama 20 menit

Larutan didinginkan dalam penangas es selama 5 menit

Ditambahkan sikloheksanon sejumlah 4,3 ml, dikocok dan disentrifugasi selama 3 menit pada 2000 RPM

Fasa sikloheksanon pada bagian atas berwarna merah muda dipisahkan

Serapan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450-600 nm, lalu ditentukan serapan maksimum

Pembuatan kurva standar

Standar asam sialat diencerkan secara bertingkat dengan kadar 10  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 30  $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{g/ml}$  dan 60  $\mu\text{g/ml}$ .

Standar diperlakukan dengan cara seperti pada poin B.

Pembacaan serapan standar asam sialat dilakukan pada panjang gelombang dengan serapan maksimal, selanjutnya dengan menggunakan rumus dibuat kurva regresi linear

$Y = aX + b$ , dimana  $a = \text{slope}$  dan  $b = \text{intercept}$

Pengukuran sampel

Hidrolisat diperiksa seperti pada B, kecuali panjang gelombang yang digunakan hanya satu saja (panjang gelombang maksimum = 549 nm)

Pengukuran dilakukan secara duplo

Rata-rata serapan dicatat dan dimasukkan ke dalam rumus kurva standar untuk mencari kadar asam sialat sampel.

#### **3.4.5.2 Pemeriksaan asam sialat jaringan hati**

A. Prosedur untuk pembuatan homogenat

Jaringan hati dikeringkan dengan kertas saring dan ditimbang 300 mg, hati diiris kecil-kecil lalu dilumat dengan menambahkan air suling 2 ml menggunakan *potter* Elvehjem.

Homegenat kemudian ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 N sampai didapatkan larutan homogenat dengan konsentrasi akhir H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N

Larutan dipanaskan 80 °C selama 1 jam

Dilakukan sentrifugasi pada 5000 RPM selama 60 menit untuk memisahkan hidrolisat dan endapannya.

Hidrolisat kemudian diperiksa seperti pemeriksaan hidrolisat plasma.

#### **3.4.9 Pemeriksaan Proteasom<sup>16,17</sup>**

Metode pemeriksaan proteasom yang digunakan pada penelitian ini adalah metode *Sandwich Enzyme linked Immunosorbent assays (Sandwich ELISA)*<sup>16</sup>. Pada penelitian ini pengukuran kadar dilakukan dengan hanya mengukur serapan (*absorbance*). Penentuan kadar proteasom yang sesungguhnya tidak dapat dilakukan karena tidak adanya standar proteasom murni.

#### **Bahan dan alat**

Antibodi kelinci antiproteasom subunit C2 (Affinity Bioreagents ORP PA1-963), Antibodi kelinci antiproteasom subunit  $\alpha$ 5 (affinity Bioreagents PA1-1962), antibodi kelinci anti imunoglobulin G kelinci berlabel peroksidase (konjugat peroksidase, Sigma A6154), Orthophenilenediamin (OPD, Sigma P 9187), Dapar substrat (Sigma). Dapar phosphate buffer saline (PBS) pH 7,4, Dapar PBS tween 20 (PBST) pH 7,4 yang mengandung sodium sitrat, larutan asam sulfat 2,5 M (Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI). Mikroplat datar 96 sumur (Nunc), pipet mikro eppendorf 5-10  $\mu$ L, Finnpiptette digital 5-40  $\mu$ L, pipet 8 saluran 50-200  $\mu$ L.

#### **Cara kerja:**

Fiksasi antibodi primer difiksasi pada permukaan mikroplat polistiren

Antibodi kelinci anti proteasom subunit C2 diencerkan 4000 kali dengan PBS pH 7,4. 100  $\mu$ L larutan antibodi dipipetkan ke dalam masing-masing sumur mikroplat, kemudian

dieram selama 24 jam pada suhu 4°C. Setelah pengeraman, cairan di dalam sumur dibuang dan setiap sumur dicuci 4 kali dengan 200 µL PBS

Penjenuhan dengan Bovine serum albumin (BSA)

100 µL BSA dipepetkan ke dalam masing-masing sumur, kemudian mikroplat dikeram selama 2 jam pada suhu kamar. Isi sumur kemudian dibuang dan tiap sumur dicuci 4 kali dengan 200 µL PBST.

Reaksi antibodi primer dengan antigen

Plasma tikus diencerkan 10 kali dengan PBST yang mengandung natrium sitrat 0,3 % sedangkan homogenat diencerkan 40 kali menggunakan dapar yang sama. 100 µL bahan uji tersebut dipipetkan ke dalam masing-masing sumur, selanjutnya mikroplat dikeram selama 1 jam pada suhu kamar. Kemudian isi sumur dibuang dan kemudian sumur dicuci 4 kali menggunakan 200 µL larutan PBST.

Reaksi antigen dengan antibodi sekunder

Antibodi kelinci anti proteasom subunit  $\alpha 5$  diencerkan 3000 kali dengan PBST dan selanjutnya didistribusikan ke dalam tiap sumur mikroplat sebanyak 100 µL. Kemudian mikroplat dikeram selama 1 jam pada suhu kamar. Setelah itu isi sumur dibuang dan tiap sumur dicuci 4 kali dengan PBST

Pelacakan kompleks imun

Antibodi primer dan antibodi sekunder yang telah terikat pada antigen akan dilacak menggunakan konjugat peroksidase. Larutan konjugat diencerkan 3000 kali dengan PBST dan didistribusikan ke dalam tiap sumur mikroplat sebanyak 100 µL, kemudian dikeram selama 1 jam pada suhu kamar. Setelah masa inkubasi tersebut cairan dibuang dan tiap sumur dicuci 4 kali menggunakan PBST.

Pewarnaan enzimatik

Tablet OPD dilarutkan dalam larutan dapar substrat. Kemudian 100 µL larutan tersebut didistribusikan ke dalam tiap sumur, selanjutnya dikeram selama 15 menit pada suhu kamar di dalam ruang gelap. Setelah 15 menit, reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 µL asam sulfat 2,5M ke dalam masing-masing sumur. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 490 nm, kemudian serapan proteasom dicatat.

### 3.4.10 Pemeriksaan histopatologis <sup>17,63</sup>

Jaringan hati yang telah dipotong difiksasi selama  $\pm$  24 jam di dalam larutan dapar formalin. Selanjutnya jaringan dimasukkan ke dalam larutan aseton 4 kali

40 menit sebelum direndam ke dalam larutan *Xilol* 2 kali 15 menit. Potongan jaringan hati direndam (*embedding*) di dalam *tissue tank* berisi parafin pada suhu 60 °C selama 30 menit. Selanjutnya potongan jaringan diletakkan dalam cetakan (*mould*). Potongan jaringan selanjutnya dituang dengan lilin parafin dan ditutup dengan *cassette*.

Blok parafin yang berisi jaringan dipotong tipis menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3-5 µm. Potongan tersebut diletakkan diatas akuades dengan suhu 60°C dan selanjutnya ditempelkan diatas kaca objek. Preparat kemudian dipanaskan menggunakan *slide warmer* pada suhu 60°C selama 10 menit. Kemudian kaca objek ini didinginkan untuk selanjutnya dilakukan pewarnaan hematoksilin-eosin (HE).

Analisis dilakukan dibawah mikroskop cahaya. Terdapat 6 parameter yang diamati pada pemeriksaan histopatologis yaitu nekrosis, inti yang ≥ 2, pleomorfik, inti hiperkromatik, proliferasi sel oval dan infiltrasi sel radang. Penilaian dilakukan terhadap 9 lapangan pandang dengan pembesaran 10 X 40 kali (lapangan pandang besar atau *high power field*). Setiap parameter diberi nilai sebagai berikut:<sup>17</sup>

Untuk parameter nekrosis, inti sel ≥ 2, pleomorfik dan inti hiperkromatik penilaiannya adalah:

- 0 : tidak ada
- 1 : jika ditemukan 1-5/lapangan pandang besar
- 2 : jika ditemukan 6-10/lapangan pandang besar
- 3 : jika ditemukan > 10/lapangan pandang besar

Penilaian untuk pemeriksaan parameter poliferasi sel oval dan infiltrasi sel radang adalah:

- 0 : tidak ada
- 1 : jika ditemukan 1-10/ lapangan pandang besar
- 2 : jika ditemukan 11-20/ lapangan pandang besar
- 3 : jika ditemukan > 20/ lapangan pandang besar

Nilai yang didapat kemudian dijumlahkan dan diinterprestasikan menggunakan standar seperti tampak pada tabel 3.

Tabel 3. Interpretasi skor pemeriksaan histopatologis

Nilai /skor total	Interprestasi
0-5	Normal

6-9	Premaligna ringan
10-13	Premaligna sedang
14-18	Premaligna berat

### 3.4.6 Pemeriksaan aktivitas enzim alanin transaminase (ALT/GPT) plasma

Aktivitas enzim alanin transaminase plasma diperiksa menggunakan prosedur Reitman dan Frankel (1957) yang telah dimodifikasi<sup>64</sup>.

#### Bahan dan alat:

Larutan NaCl 0,85%, Dapar fosfat 0,1 M pH 7,4, Standar piruvat 2 mmol/L. Larutan dapar substrat mengandung 2 mM asam  $\alpha$  keto glutarat dan 100 mM dL alanin pH 7, Larutan pewarna 1,5 mM 2,4-dinitrofenilhidrazin, Larutan NaOH 0,4 N, alat pemusing, penangas air dan spektrofotometer.

#### Cara Kerja:

Tabel 4. Pembuatan kurva standar

Tabung	1	2	3	4	5	6
Aktivitas GPT (unit/L)	0	14	32	51	69	92
Larutan standar piruvat (mL)	0	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
Larutan dapar substrat (mL)	1,0	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50
Campur dengan baik						
Pereaksi warna (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Campur dengan baik						
Larutan NaOH 0,4N (mL)	10	10	10	10	10	10
dicampur dengan baik, setelah 5-20 menit baca serapan pada panjang gelombang 500-560 nm						

Tabel 5. Pemeriksaan aktivitas GPT plasma

Tabung	Blangko	Bahan uji
Dapar substrat GPT	0,5 mL	0,5 mL
diletakkan dalam penangas air 37°C selama 5 menit		
Bahan uji (plasma)		0,1 mL

dikeram pada suhu 37°C selama 30 menit		
Pereaksi warna	0,5 mL	0,5 mL
Bahan uji (plasma)	0,1 mL	
dicampur dan didiamkan dalam suhu kamar selama tepat 20 menit		
Larutan NaOH 0,4N	5 mL	5mL
Campur, setelah 5-30 menit baca serapan pada panjang gelombang 500-560 nm		

### 3.4.7. Pemeriksaan kadar Protein total, albumin plasma dan rasio albumin/globulin <sup>65,66</sup>

Metode yang digunakan untuk pemeriksaan protein total adalah metode Biuret dan untuk albumin menggunakan metode Brom Cresol Green (BCG). Pemeriksaan kedua parameter ini dilakukan dengan menggunakan kit Diagnostika, seperti yang disajikan pada tabel 6 dan 7.

#### Bahan dan Alat:

Pereaksi biuret, larutan standar protein, pereaksi BCG dan standar albumin, pipet dan mikropipet 10 µL. spektrofotometer, tabung reaksi dll.

#### Cara Kerja:

Tabel 6. Pemeriksaan kadar albumin

tabung	Blanko	standar	uji
Zat			
Reagensia BCG	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
plasma			10 µL
standar albumin		10 µL	
dicampur homogen dan diamkan pada suhu kamar selama 60 detik,			
baca serapan pada 630 atau 578 nm			

Kadar albumin ditentukan dengan menggunakan rumus:

Kadar albumin (g/dL) = (serapan uji-blanko / serapan standar-blanko) X kadar standar

Tabel 7. Pemeriksaan kadar protein total

Zat	Tabung		
	Blanko	standar	uji
Reagensia biuret	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
plasma			20 µL
standar protein		20 µL	
dicampur homogen dan diamkan pada suhu kamar selama 5 menit			
baca serapan pada 540 atau 546 nm			

Kadar protein total ditentukan dengan menggunakan rumus:

Kadar protein total (g/dL) = (serapan uji-serapan blanko/serapan standar-serapan blanko) X kadar standar

Sebelum menentukan rasio albumin/globulin dilakukan penentuan kadar globulin yaitu kadar protein total-albumin. Setelah kadar globulin ditentukan maka rasio albumin/globulin dapat dihitung langsung dengan rumus [Albumin]/[globulin].

#### 3.4.8. Pemeriksaan elektroforesis protein plasma <sup>67</sup>

Pemeriksaan elektroforesis dilakukan dengan menggunakan kit elektroforesis protein yang diproduksi oleh Helena Laboratories.

##### Bahan dan Alat:

Larutan pewarna *Ponceau S* (Cat. No.5526), *Electra*<sup>®</sup> *HR buffer* (Cat. No. 5806), larutan *clear aid* (Cat. No. 5605), asam asetat glasial, metanol, Titan III *Cellulosa acetate plate* (Cat.No.3023 atau 3024), *PermaClear Solution* (Cat.No. 4950), kertas saring, aparat elektroforesis (*electrophoresis chamber horizontal, applicator, plat sampel dan lain-lain*), *power supply*.

##### Cara Kerja:

Preparasi plat Titan III

Plat ditandai dengan marker pada bagian plat yang mengkilat.

Plat direndam ke dalam *Electra*<sup>®</sup> *HR buffer* selama 20 menit dengan perlahan agar tidak ada gelembung udara yang terperangkap pada plat

Preparasi *electrophoresis chamber*

Kira-kira 100 mL larutan dapar HR dituang ke dalam tiap-tiap *chamber* elektroforesis. Kertas saring yang sudah dilipat memanjang dilekatkan pada kedua pinggir *electrophoresis chamber* yang berperan untuk mengalirkan arus listrik dari buffer ke plat. *Electrophoresis chamber* ditutup agar jenuh dengan uap larutan dapar.

#### Aplikasi sampel

Setiap sumur pada plat sampel diisi dengan 3  $\mu$ L sampel menggunakan mikropipet, kemudian plat ditutup dengan kaca objek.

Aplikator ditempelkan ke sampel dengan cara menekan secara merata sebanyak 3-4 kali

Plat Titan III dipindahkan dengan menggunakan ujung jari lalu diletakkan diatas tempat aplikasi sampel. Tekan aplikator secara merata pada permukaan plat sebanyak 3-4 kali tahan selama 5 detik.

#### Elektroforesis

Plat diletakkan pada *chamber* dengan sisi selulosa asetat menghadap kebawah, tutup *chamber* dengan baik dan biarkan selama 30 detik

Elektroforesis dilakukan selama 15 menit dengan tegangan 180 volt.

#### Pengamatan pita-pita protein

Pada akhir elektroforesis, plat dipindahkan dari *electrophoresis chamber*, kemudian plat direndam di dalam larutan 40-50 ml larutan Ponceau S selama 6 menit.

Dilakukan *destaining* menggunakan asam asetat 5 % selama 2 menit.

Setelah *destaining* dilakukan dehidrasi dengan methanol selama 5 menit.

Sekarang pita-pita protein dapat diamati atau dipotret menggunakan kamera/*scanner*.

Pita-pita protein dapat diukur intensitas warna dan ukurannya (*pixel*) dengan menggunakan software Adobe Photoshop®. Hasil perkalian intensitas dan luas pita akan menghasilkan suatu nilai, yang kemudian dapat ditampilkan dalam bentuk grafik yang menggambarkan pola elektroforesis protein. Cara ini sesuai dengan penelitian Dewi.<sup>68</sup>

#### Pengolahan dan analisis data <sup>69</sup>

Pengolahan data pada penelitian ini dilakukan secara manual, dengan kalkulator dan komputer. Analisis data dilakukan dengan menggunakan *program Stasistical*

*Package for Science* (SPSS) versi 12. Untuk membandingkan hasil pemeriksaan pada kelompok kontrol, BM, FAA dan BM+FAA dilakukan pengujian secara statistik. Pertama kali dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Oleh karena data berdistribusi normal dan homogen maka digunakan uji parametrik ANOVA 1 arah. Apabila uji ANOVA 1 arah didapatkan bermakna, dilakukan uji untuk mengetahui perbedaan antar kelompok menggunakan uji Tukey.