



## BAB 3. BAHAN DAN METODE

### 3.1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia pangan Faperika Unri, Laboratorium Bersama Hewan Percobaan Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian dan SEAFast Center, Institut Pertanian Bogor; Laboratorium Biokimia dan kimia, TPG-IPB.

### 3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada percobaan ini meliputi bahan utama terdiri dari teripang pasir (*Holothuria scabra*) yang didapat dari nelayan di Kepulauan Riau dan Balai Budidaya Laut (BBL) Lampung. Teripang pasir yang digunakan adalah teripang dengan bobot badan 300-500 gram/ekor. Hewan percobaan yang digunakan dalam bioassay adalah tikus putih *Sparague Dawley* jantan dengan berat tubuh 150-200 g per ekor yang diperoleh dari Biofarmaka IPB Bogor. Bahan kimia yang digunakan adalah bahan kimia untuk pengujian sifat kimia meliputi, HCL, NaOH, buffer fosfat, acarbose, enzim tripsin, larutan glukosa, aquades, etanol teknis, dll. Disamping itu digunakan juga bahan-bahan kimia untuk analisis proksimat seperti protein total metode mikro-kjeldahl, analisis lemak, kadar air, dan kadar abu. Bahan kimia untuk pengujian bioassay meliputi alloxan tetrahidrat untuk menginduksi diabetes yang dibeli indent dari Singapura via suplier bahan kimia di Bogor. Bahan habis pakai meliputi: kapas, tissue, aluminium foil, kertas saring biasa, whatman 42, aquades, sarung tangan, masker mulut, dan bahan-bahan untuk pakan standar tikus.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari: instrumen seperti spektrofotometer UV-Vis, sentrifuse,



evaporator vacum, Blood glucose Test Meter GlucoDr, oven, freeze dryer, pH meter, HPLC, waterbath, refrigerator, tissue embedding console, mikroskop, timbangan, alat analisis protein (Kjeldahl), lemak (Soxhlet), kadar abu, dan kadar air (AOAC, 2005). Alat habis pakai meliputi wadah plastik, hot plate, bunsen, cetakan kotak preparat, keranjang preparat, jar, kertas label, botol sampel, sarung tangan, masker mulut, microtome disposable blades. Alat pemeliharaan hewan percobaan seperti kandang plastik, canul, syringe, tempat pakan dan minum tikus percobaan, peralatan untuk pembuatan ransum. Alat gelas meliputi pipet tetes, pipet ukur, pipet volume, tabung reaksi, mikro pipet, beker gelas, gelas ukur, pengaduk gelas, botol timbang, erlenmeyer, cawan petri, gelas obyek, gelas penutup, corong gelas, pipet eppendorf, dsb.

### 3.3. Metodologi Penelitian

#### 3.3.1. Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan percobaan untuk penelitian ini adalah rancangan acak lengkap. Menurut. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis sidik ragam (ANOVA) (Steel *et al.* 1993).

#### 3.3.2. Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 5 (lima) tahap yaitu:

1. Persiapan dan analisis komposisi kimia (proksimat) kulit teripang
2. Pembuatan dan analisis asam amino total dan bebas hidrolisat, isolat, dan konsentrat protein kulit teripang serta uji aktifitas daya hambatnya terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase
3. Uji efek hipoglikemik hidrolisat, isolat, dan konsentrat protein kulit teripang pada tikus coba.



1. Dianggap mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan Universitas Riau.
2. Dianggap mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.

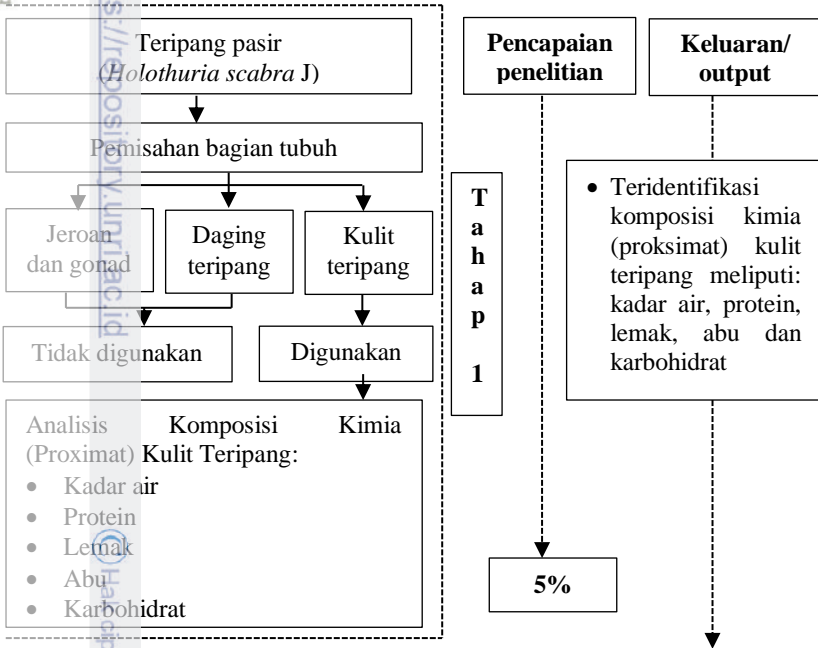
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

4. Pengujian bioassay (in vivo) pengaruh hidrolisat, isolat, dan konsentrat protein kulit teripang terhadap glukosa darah tikus normal dan DM
5. Pengujian histopatologi (immunohistokimia) pengaruh hidrolisat, isolat, dan konsentrat protein kulit teripang terhadap jaringan pankreas tikus normal dan DM.

Bagan alir rencana penelitian, capaian dan keluaran (output) setiap tahap penelitian sebagai berikut:

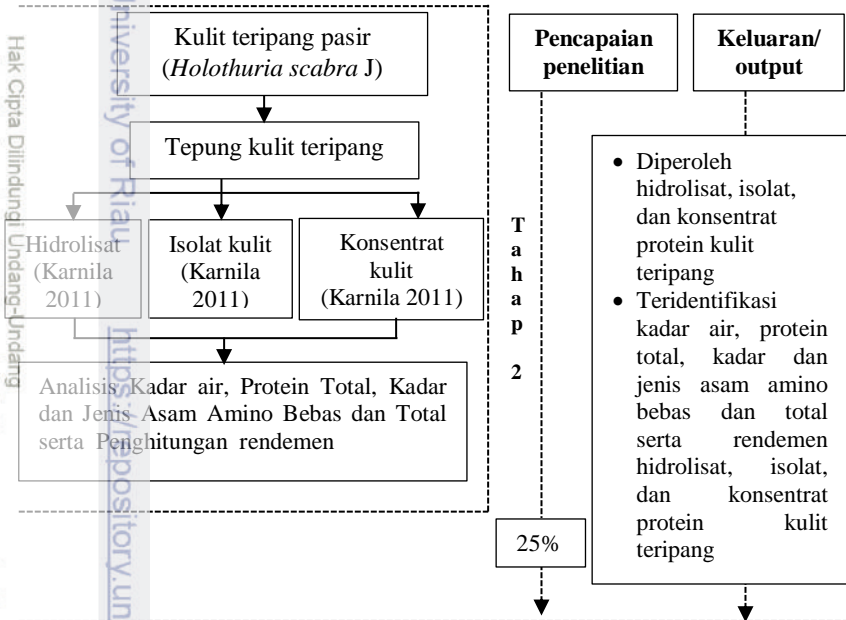
## BAGAN ALIR RENCANA PENELITIAN

### 1. Persiapan dan Analisis Komposisi Kimia (Proksimat) Kulit Teripang Pasir

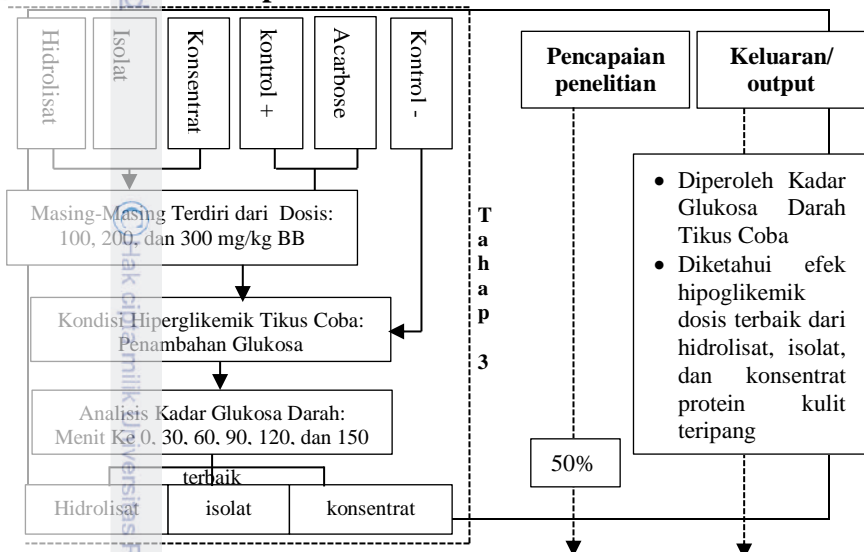




## 2. Pembuatan dan Analisis Asam Amino Total dan Bebas Hidrolisat, Isolat, dan Konsentrat Protein Kulit Teripang

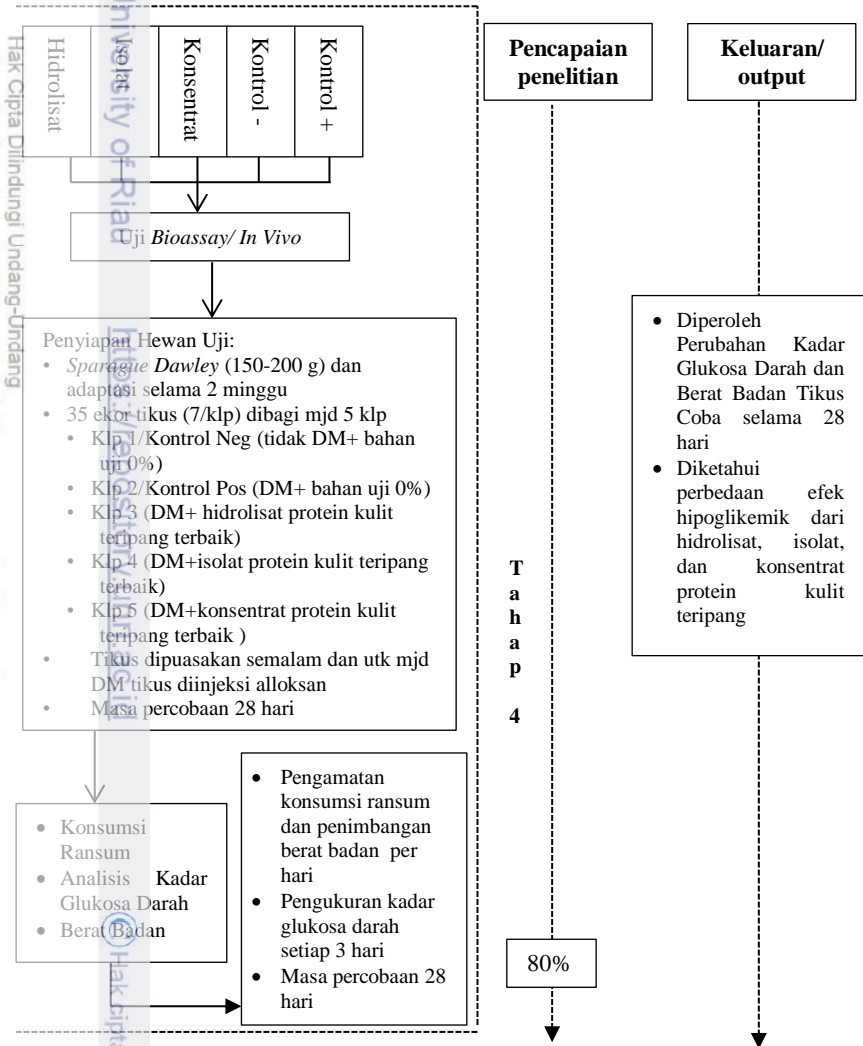


## 3. Uji Efek Hipoglikemik Hidrolisat, Isolat, dan Konsentrat pada Tikus Coba



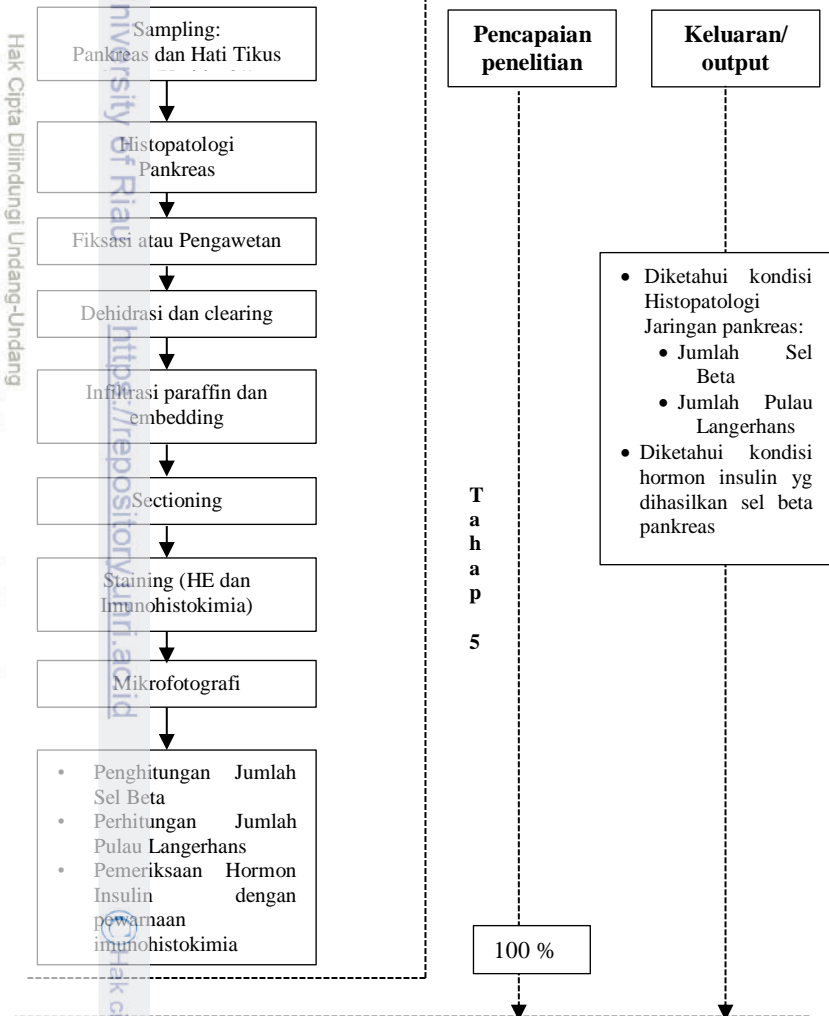


#### 4. Pengujian Bioassay (*In Vivo*) Pengaruh Hidrolisat, Isolat, dan Konsentrat terhadap Glukosa Darah Tikus Normal dan DM





## 5. Pengujian Histopatologi (Immunohistokimia) Pengaruh Hidrolisat, Isolat, dan Konsentrat Terhadap Jaringan Pankreas Tikus Normal dan DM



### 1) Persiapan dan Analisis Komposisi Kimia (Proksimat) Kulit Teripang Pasir

Pada tahap ini jenis teripang yang digunakan adalah teripang pasir (*Holothuria scabra*). Teripang yang akan digunakan terlebih dahulu dibersihkan dan dipisahkan antara





1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan Universitas Riau.
2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

kulit teripang dengan bagian tubuh lainnya (daging, jeroan, gonad). Selanjutnya kulit teripang dicuci dan dilakukan penggilingan, kemudian dilakukan pengukuran beberapa parameter kimia (proksimat) meliputi analisa protein total, kandungan lemak, kadar abu, kadar air, dan karbohidrat. Analisa protein total menggunakan metode Kjeldahl, kandungan lemak dengan metode Soxhlet, kadar abu (AOAC, 2005), kadar air (AOAC, 2005), dan karbohidrat (by difference).

## **2) Pembuatan dan Analisis Asam Amino Total dan Bebas Hidrolisat, Isolat, dan Konsentrat Protein Kulit Teripang**

### **a) Hidrolisat Protein Kulit Teripang**

Percobaan ini dilakukan dengan menggunakan metode Karnila *et al.* (2011a) dengan sedikit modifikasi. Pada tahap awal kulit teripang segar dibersihkan, dicuci dan dipisahkan dari bagian yang tidak diinginkan. Selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran dengan penggilingan. Kemudian timbang 4 g tepung kulit dan suspensikan ke aquades sejumlah 100 ml (homogenisasi selama 2 menit). Kemudian dilakukan perebusan pada suhu 98°C selama 15 menit. Setelah homogenat dingin, maka dilakukan penambahan enzim tripsin sejumlah 880 µg/ ml homogenat. Proses hidrolisis dilakukan pada suhu 37°C dan pH 7.5 selama 3-30 jam. Selanjutnya dilakukan perebusan pada suhu 85°C selama 15 menit untuk menginaktifkan enzim. Setelah proses hidrolisis selesai dilanjutkan dengan pemisahan supernatan/fasa cair dari presipitan/residu menggunakan sentrifugasi (10.000 rpm, selama 15 menit). Supernatan yang diperoleh, dievaporasi dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* sampai semua pelarut menguap. Hasil evaporasi yang diperoleh pada tahap ini merupakan hasil hidrolisat teripang



dan selanjutnya dilakukan proses *freeze dryer*. Pengamatan terhadap hidrolisat teripang yang dihasilkan meliputi rendemen, kadar air (AOAC, 2005), kadar protein total (metode Kjeldahl), kadar asam amino bebas, jenis asam amino total dan bebas.

## b) Isolat Protein Kulit Teripang

Prosedur pembuatan isolat protein kulit teripang berdasarkan metode Karnila *et al.* (2011a) sebagai berikut. Pada tahap awal teripang segar dibersihkan, dicuci dan kulit teripang dipisahkan dari bagian yang tidak diinginkan. Selanjutnya dilakukan pemotongan kulit teripang untuk pengecilan ukuran dengan penggilingan (penepungan). Kemudian timbang sebanyak 100 g daging teripang dan disuspensikan dalam aquades dengan rasio bahan: aquades (1: 10 b/v) dan diatur pH-nya dengan cara penambahan NaOH 35% secara bertahap menggunakan pipet tetes sambil diaduk menggunakan *magnetic stirer* sampai mencapai pH 12. Selanjutnya dipanaskan pada suhu 40°C, selama 30 menit sambil diaduk menggunakan *magnetic stirer* dan selanjutnya di sentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm, selama 15 menit (sentrifugasi 1). Supernatan dipisahkan, dan diatur pH-nya menjadi 4 dengan cara penambahan HCl 6N secara bertahap menggunakan pipet tetes sambil diaduk menggunakan *magnetic stirer*. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm, selama 15 menit (sentrifugasi 2). Endapan yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan *freeze dryer* sehingga diperoleh sampel dalam bentuk isolat protein teripang. Pengamatan terhadap isolat protein teripang yang dihasilkan meliputi rendemen, kadar air (AOAC, 2005), kadar protein total (metode Kjeldahl), kadar asam amino bebas, jenis asam amino total dan bebas.

1. Dianggap mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan Universitas Riau.
2. Dianggap mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.





1. Diarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan Universitas Riau.
2. Diarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.

### c) Konsentrat Protein Kulit Teripang

Pembuatan konsentrat protein kulit teripang dilakukan dengan cara maserasi menurut metode Karnila *et al.* (2011b) sebagai berikut. Percobaan dilakukan dengan cara perendaman kulit teripang yang akan diekstrak pada lemari pendingin (suhu  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) menggunakan bahan pelarut selama 24 jam. Pada tahap awal kulit teripang dibersihkan dandipisahkan dari bagian yang tidak diinginkan, kemudian dilakukan pemotongan dan penggilingan untuk pengecilan ukuran. Timbang 100 g dan masukkan ke dalam labu Erlemeyer, kemudian direndam dalam pelarut aseton dengan rasio 1:2 b/v, selanjutnya dimasukkan ke dalam lemari pendingin selama 24 jam. Setelah ekstraksi selesai, dilanjutkan dengan pemisahan supernatan/fasa cair dari presipitat/residu menggunakan sentrifugasi (10000 rpm, selama 15 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ ). Presipitat yang diperoleh pada tahap ini selanjutnya dilakukan proses freeze dryer. Pengamatan terhadap konsentrat protein teripang yang dihasilkan meliputi rendemen, kadar air (AOAC, 2005), kadar protein total (metode Kjeldahl), kadar asam amino bebas, jenis asam amino total dan bebas.

### d) Pengukuran Rendemen, Kadar Asam Amino Bebas, Jenis Asam Amino Total dan Bebas

#### Rendemen

Rendemen dihitung berdasarkan persentase berat kering hidrolisat, isolat, dan konsentrat kulit teripang kering dibagi berat kering sampel awal yang digunakan. Rendemen hidrolisat, isolat, dan konsentrat kulit teripang dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat kering hidrolisat/isolat/ konsentrat} \times 100\%}{\text{Berat kering sampel awal}}$$



## Analisis Jenis dan Kadar Asam Amino Total dan Bebas

Analisis jenis dan kadar asam amino total dan bebas dilakukan dengan metode reaksi pra kolom gugus amino dengan pereaksi tertentu membentuk suatu derivat yang dapat menyerap sinar UV atau berfluoresensi (Karnila 2012).

## c) Uji Efek Hipoglikemik Hidrolisat, Isolat, dan Konsentrat pada Tikus Coba

Pengujian ini bertujuan untuk menentukan aktifitas hipoglikemik dari hidrolisat, isolat, dan konsentrat protein kulit teripang. Dosis masing-masing bahan yang akan diuji hipoglikemiknya adalah 100, 200, dan 300 mg/kg bb yang diberikan per oral. Sebagai pembanding positif diberikan obat acarbose 4,5 mg/kg bb tikus per oral. Untuk membuat tikus hiperglikemia sesaat, tikus diinduksi menggunakan larutan D-glukosa (Widowati 2007 dan Karnila 2012) sebanyak 1 cc/ekor tikus per oral yang diberikan 10 menit setelah tikus diberi ekstrak, hidrolisat dan isolat protein teripang maupun obat acarbose.

Sebanyak 48 ekor tikus putih jantan galur *Sparague Dawley* umur dua bulan digunakan dalam penelitian ini. Tikus percobaan dibagi ke dalam 12 kelompok perlakuan yaitu (1) kelompok kontrol negatif, yaitu tikus tidak diberi bahan uji dan tidak hiperglikemia; (2) kelompok kontrol positif hiperglikemia, yaitu tikus hiperglikemia dan tidak diberi bahan uji; (3-11) kelompok hiperglikemia dan diberi bahan uji hidrolisat, isolat, dan konsentrat protein kulit teripang dengan masing-masing dosis 100, 200, 300, mg/kg bb per oral, dan (12) kelompok kontrol obat positif hipoglikemia, yaitu tikus hiperglikemia dan diberi obat acarbose 4,5 mg/kg bb. Kadar glukosa darah tikus percobaan ditentukan dengan metode glucose oxidase biosensor, menggunakan alat Blood glucose Test Meter GlucoDr<sup>TM</sup>



1. Dianggap mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan Universitas Riau.
2. Dianggap mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

model AGM-2100 (diproduksi oleh allmedicus Co Ltd., Korea). Pengukuran dilakukan pada menit ke: 0, 30, 60, 90, 120, dan 150 setelah perlakuan.

#### 4) Pengujian *Bioassay (InVivo)* Pengaruh Hidrolisat, Isolat, dan Konsentrat terhadap Glukosa Darah Tikus Normal dan DM

Pengujian *bioassay* ini bertujuan untuk melihat pengaruh hidrolisat, isolat, dan konsentrat protein kulit teripang terhadap kadar glukosa darah dan berat badan. Bahan uji *bioassay* ini menggunakan hidrolisat, isolat, dan konsentrat protein kulit teripang yang memiliki efek hipoglikemik terbaik pada dosis terendah yang telah dilakukan pada tahap 3.

Untuk melihat efek bahan uji maka digunakan tikus putih jantan *Sparague Dawley* (150-200 g) yang terlebih dahulu dilakukan adaptasi selama 2 minggu dengan tujuan untuk membiasakan tikus dengan lingkungan penelitian. Ransum yang diberikan selama masa adaptasi merupakan ransum basal. Ransum basal dan air diberikan secara *ad libitum*. Setelah tahapan adaptasi selesai maka tikus siap dikelompokkan dan diinjeksi alloxan. Masing-masing tikus yang akan digunakan dalam penelitian ditimbang dan dicatat berat badannya. Sebanyak 35 ekor tikus dikelompokkan dalam lima kelompok (tujuh ekor tikus per kelompok). Kelompok pertama yaitu kontrol negatif (tidak DM + bahan uji 0%), kelompok dua kontrol positif (DM + bahan uji 0%), kelompok tiga grup DM dengan pemberian sampel hidrolisat protein kulit teripang (terbaik tahap III), kelompok empat grup DM dengan pemberian sampel isolat protein kulit teripang (terbaik tahap III), kelompok lima grup DM dengan pemberian sampel konsentrat protein kulit teripang (terbaik tahap III).



Sebelum diinjeksi tikus dipuasakan selama satu malam. Injeksi alloxan dilakukan dengan dosis 120 mg/kg bb intraperitoneal (Kim *et al.* 2006). Kondisi tersebut menyebabkan timbulnya DM. Tikus dikatakan DM jika kadar glukosa darah sesaat diatas 200 mg/dl. Injeksi dilakukan secara intraperitoneal pada semua tikus, kecuali kontrol negatif, sehingga tikus-tikus tersebut menderita DM. Kelompok kontrol negatif tidak diinjeksi alloxan dan sebagai gantinya diinjeksi dengan natrium fisiologis dengan dosis 1 ml/kg bb. Masa percobaan adalah selama 28 hari. Selama masa percobaan, kelompok perlakuan diberi ransum setiap harinya dengan sampel sebagaimana perlakuan diatas, sedangkan kelompok kontrol (negatif dan positif) tetap diberi ransum standar. Pengamatan dilakukan terhadap konsumsi ransum dan peningkatan berat badan setiap hari. Pengukuran kadar glukosa darah tikus percobaan dilakukan setiap 3 hari.

## 5) Uji Histopatologi (Immunohistokimia) Pengaruh Hidrolisat, Isolat dan Konsentrat terhadap Jaringan Pankreas Tikus Normal dan DM

Analisis histopatologi jaringan pankreas bertujuan untuk menganalisis perubahan histopatologi sel beta jaringan pankreas tikus percobaan (DM dan tidak DM). Percobaan dilakukan setelah masa percobaan berakhir (hari ke-29).

Analisis histopatologi diawali dengan pembuatan sediaan histopatologi yang terdiri atas sembilan tahapan (Kiernan 1990), yaitu pengambilan sampel (sampling), fixasi (pengawetan), dehidrasi, penjernihan (*clearing*), infiltrasi parafin, pencetakan (*embedding*), pemotongan (*sectioning*) dan pewarnaan (*staining*) Hematoxylin-Eosin dan imunohistokimia terhadap sel beta, serta pengamatan jaringan pankreas.