

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang potensi beberapa bentuk sediaan Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap gambaran histologis pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang mengalami nekrosis ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri atas 2 faktor dengan 3 kali ulangan. Faktor pertama dalam penelitian ini adalah sediaan daun pegagan yang terdiri atas 3 bentuk sediaan yaitu bentuk ekstrak, air rebusan dan segar. Faktor kedua adalah lama pemberian sediaan daun pegagan (28 hari dan 42 hari). Perlakuan dalam penelitian adalah hasil kombinasi antar faktor dari seluruh taraf perlakuan yaitu terdiri atas 10 perlakuan termasuk di dalamnya 2 kontrol (kontrol positif dan negatif) masing-masing terdiri atas 3 ulangan.

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan antara Bentuk Sediaan Pegagan dan Lama Pemberian Sediaan Pegagan

Bentuk sediaan	Lama pemberian (hari)
Bentuk segar	28
Bentuk air rebusan	
Bentuk ekstrak	
Bentuk segar	42
Bentuk air rebusan	
Bentuk ekstrak	

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yang meliputi:

1. Variabel bebas yaitu faktor yang sengaja diubah atau dimanipulasi oleh peneliti dengan maksud untuk mengetahui perubahan apa yang terjadi (Nurhayati, 2007). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bentuk sediaan pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban), yang terdiri atas tikus normal/tanpa perlakuan, tikus yang diinduksi aloksan dan diberi perlakuan ekstrak pegagan dengan dosis 300 mg/kg BB, tikus yang diinduksi aloksan dan diberi perlakuan pegagan segar dengan dosis 0,2 g/kg BB, tikus yang diinduksi aloksan dan diberi perlakuan air rebusan pegagan dengan dosis 0,64 ml/kg BB, dan tikus yang diinduksi aloksan tanpa pemberian perlakuan pegagan masing-masing diberikan selama 28 dan 42 hari.
2. Variabel terikat yaitu faktor yang diukur atau diamati sebagai akibat dari manipulasi variabel bebas (Nurhayati, 2007). Variabel terikat yang digunakan adalah histopatologis pankreas tikus putih (*Rattus norvegicus*).
3. Variabel kendali yaitu faktor yang sengaja dikendalikan supaya tidak mempengaruhi variabel bebas maupun variabel terikat (Nurhayati, 2007). Variabel terkendali adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina Strain Wistar yang diberi makan pellet, diberi minum secara ad libitum (berlebih), dan kandang atau bak plastik dengan alas sekam.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Sistemik dan Laboratorium Optik Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang mulai Juli sampai November 2011.

3.4 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina Strain Wistar dengan umur \pm 4 bulan, berat badan 200-250 gram. Perkiraan besar sampel yang digunakan adalah sekitar 30 ekor tikus betina yang dibagi menjadi 10 kelompok perlakuan, setiap kelompok perlakuan terdiri dari 3 ekor tikus sebagai ulangan.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi: kandang pemeliharaan, disposable syringe 1 ml, sonde lambung hasil modifikasi dari spuit 3 ml dan *pediatric feeding tube Fr.5*, timbangan analitik, corong buchner, perangkat rotary evaporator vacum, alat gelas, hot plate, pipet tetes, dissecting set, papan seksi, botol organ, objek glass, deck glass, kaset cetakan, tissue processor, tissue embedding, microtome, water bath, mikroskop binokuler Nikon E 100.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar diperoleh dari peternak tikus, pelet, serbuk daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) diperoleh dari Balai Materia Medika Batu, pegagan segar, Na CMC 0,5%, NaCl fisiologis 0,9%, aquades, *chloroform*, formalin 10%, ethanol

(80%, 90%, 96% dan absolut), parafin, running tap water, xylene, dan pewarna HE.

3.6 Pelaksanaan Penelitian

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dilakukan disiapkan tempat pemeliharaan hewan coba yang meliputi kandang (bak plastik) berbentuk segi empat, sekam, tempat makan dan minum tikus. Tikus diaklimasi di laboratorium selama 4 minggu kemudian dibagi menjadi beberapa kelompok yang terdiri atas kontrol (tikus normal tidak mengalami nekrosis pankreas) dan kelompok perlakuan yaitu tikus yang mengalami nekrosis pankreas.

3.6.2 Penyerentakan Siklus Birahi

Sebelum diberikan perlakuan maka perlu dilakukan penyerentakan birahi. Hal ini dilakukan karena hewan coba yang digunakan berjenis kelamin betina, dimana kondisi fisiologis tubuhnya cenderung dipengaruhi oleh siklus birahi. Penyerentakan dilakukan dengan memberikan hormon prostaglandin yang diinjeksikan secara intramuskular sebanyak 0,4 ml kemudian dibuat preparat apusan. Untuk mengetahui kesamaan siklus, pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop.

3.6.3 Membuat Kondisi Nekrosis Pankreas

Menurut Szkudelski (2001), aloksan di dalam tubuh mengalami metabolisme oksidasi reduksi menghasilkan radikal bebas dan radikal aloksan. Radikal ini mengakibatkan kerusakan pada sel beta pankreas. Pada pulau Langerhans terlihat pengurangan jumlah massa sel, beberapa pulau Langerhans

mengalami kerusakan, dimana ukuran menjadi lebih kecil bahkan ada yang hancur dan menghilang. Akibat kerusakan sel beta, sel beta tersebut tidak mampu menghasilkan insulin sehingga terjadi penyakit diabetes yang dikarakterisasi dengan keadaan hiperglikemia. Hiperglikemia Untuk membuat tikus mengalami nekrosis pankreas, maka tikus diinduksi aloksan secara intravena sebanyak 2 kali dengan dosis 65 mg/kg BB sehingga menderita diabetes kronis. Induksi yang pertama dosis yang digunakan adalah 65 mg/kg BB. Sebelum penyuntikan, tikus dipuasakan selama 24 jam. Hari ke 8 setelah penyuntikan pertama, tikus diinduksi kembali dengan alloxan monohidrat dengan dosis 65 mg/kg BB.

Untuk mengetahui kurun waktu kerusakan pankreas tikus dilakukan konversi usia manusia ke usia tikus, dimana 10 tahun kurun waktu pada manusia sama dengan 1 bulan (4 minggu) kurun waktu tikus (Djari, 2008). Diperkirakan dalam kurun waktu 4 minggu sudah terjadi kerusakan mikrovaskular yang menyebabkan terjadinya nekrosis akut pada pankreas karena kerusakan mikrovaskular pada manusia terjadi dalam kurun waktu 10-15 tahun. Pada penelitian ini tikus yang telah diinduksi aloksan dibiarkan selama 6 minggu untuk menunggu terjadinya nekrosis pankreas. Diperkirakan dalam kurun waktu 6 minggu sudah terjadi kerusakan mikrovaskular yang menyebabkan terjadinya nekrosis akut pada pankreas.

3.6.4 Pembagian Kelompok Sampel

Setelah diinduksi dengan alloxan, maka tikus dibagi menjadi 10 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor tikus sebagai ulangan. Kelompok tersebut dibagi sebagai berikut:

- a. Kelompok I (kontrol -1) : Tikus diberikan aquades selama 28 hari kemudian dibedah pada hari 29.
- b. Kelompok II (kontrol - 2) : Tikus diberikan aquades selama 42 hari kemudian dibedah pada hari 43.
- c. Kelompok III (kontrol + 1): Tikus diinduksi dengan alloxan tanpa pemberian pegagan kemudian dibedah pada hari 29.
- d. Kelompok IV (kontrol + 2): Tikus diinduksi dengan alloxan tanpa pemberian pegagan kemudian dibedah pada hari 43.
- e. Kelompok V: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi ekstrak pegagan dengan dosis 300 mg/kg BB per hari selama 28 hari kemudian dibedah pada hari 29.
- f. Kelompok VI: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi ekstrak pegagan dengan dosis 300 mg/kg BB per hari selama 42 hari kemudian dibedah pada hari 43.
- g. Kelompok VII: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi daun pegagan segar sebanyak 0,2 gram/kg BB per hari selama 28 hari kemudian dibedah pada hari 29.
- h. Kelompok VIII: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi daun pegagan segar sebanyak 0,2 gram/kg BB per hari selama 42 hari kemudian dibedah pada hari 43.
- i. Kelompok IX: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi air rebusan daun pegagan sebanyak 0,64 ml/kg BB per hari selama 28 hari kemudian dibedah pada hari 29.

- j. Kelompok X: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi air rebusan daun pegagan sebanyak 0,64 ml/kg BB per hari selama 42 hari kemudian dibedah pada hari 43.

3.6.5 Pembuatan Bentuk Sediaan Pegagan

1. Ekstrak Pegagan

Pembuatan ekstrak pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dilakukan melalui tahapan sebagai berikut: Serbuk daun pegagan yang telah halus dimaserasi dengan pelarut ethanol 70% selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Serbuk yang telah dimaserasi disaring dengan corong buchner. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang dihasilkan selanjutnya disimpan dan digunakan untuk perlakuan (Kumar dan Gupta, 2003). Ekstrak kental tersebut agar bisa diberikan pada hewan coba dilarutkan terlebih dahulu dengan Na CMC 0,5% sebagai surfaktan sampai volume 1 mL.

2. Air Rebusan Pegagan

Pembuatan air rebusan berdasarkan kebiasaan yang dilakukan masyarakat Jawa yaitu: segenggam penuh daun pegagan (kira-kira 20 lembar) direbus dengan 1 gelas air sampai menjadi $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ gelas (50-100 ml) diminum 3 kali sehari (Mardiswoyo, 1985). Manusia dewasa dengan berat badan 70 kg mengkonsumsi 150-300 ml per hari atau rata-rata 225 ml berarti dosis per kg BB adalah 3,2 ml, tikus dengan berat 200 g mengkonsumsi sebanyak 0,64 ml.

3. Daun Pegagan Segar

Pengkonsumsian daun pegagan segar berdasarkan jumlah konsumsi lalapan segar daun pegagan oleh masyarakat Jawa yaitu dalam sehari kira-kira 70 g daun pegagan (Wijayakusuma, 1994). Manusia dewasa dengan berat badan 70 kg mengkonsumsi 70 g per hari berarti dosis per kg BB adalah 1 g, tikus dengan berat 200 g mengkonsumsi sebanyak 0,2 g daun pegagan segar.

3.6.6 Pembuatan Sediaan Larutan Na CMC 0,5%

Sediaan larutan Na CMC 0,5% dibuat dengan menaburkan 500 mg Na CMC kedalam 10 ml aquadest panas, kemudian dibiarkan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai jel. Selanjutnya diaduk hingga menjadi massa yang homogen dan diencerkan dalam labu ukur dengan aquadest hingga volume 100 ml.

3.6.7 Pemberian Perlakuan

Beberapa bentuk sediaan pegagan diberikan pada tikus betina secara oral selama 6 minggu setelah injeksi alloxan monohidrat. Pemberian beberapa bentuk sediaan pegagan dilakukan selama 28 dan 42 hari sesuai dosis dan volume yang telah ditentukan agar tidak melebihi kapasitas gastrik tikus, kemudian pada hari ke 29 dan ke 43 dilakukan pembedahan untuk isolasi pankreas untuk pembuatan preparat histologis.

3.6.8 Pembuatan Preparat Histologis Pankreas (*Rattus norvegicus*).

Pembuatan preparat histologis pankreas tikus dilakukan dengan langkah sebagai berikut:

1. Tahap Fiksasi

Pada tahap ini, pankreas difiksasi pada larutan formalin 10% selama 1 jam, diulang sebanyak 2 kali pada larutan yang berbeda.

2. Tahap Dehidrasi

Pada tahap ini pankreas yang telah difiksasi kemudian didehidrasi pada larutan ethanol 70 % selama 1 jam, kemudian dipindahkan dalam larutan ethanol 80%, dilanjutkan kedalam larutan ethanol 95 % sebanyak 2 kali dan dalam ethanol absolut selama 1 jam dan diulang sebanyak 2 kali pada ethanol absolut yang berbeda.

3. Tahap Clearing (Penjernihan)

Pada tahap ini, pankreas yang telah didehidrasi kemudian diclearing untuk menarik kadar ethanol dengan menggunakan larutan xylene selama 1,5 jam dan dilanjutkan ke larutan xylene selama 1,5 jam.

4. Tahap Embedding

Pada tahapan ini, pankreas dimasukkan kedalam kaset dan diinfiltrasi dengan menuangkan paraffin yang dicairkan pada suhu 60°C, kemudian paraffin dibiarkan mengeras dan dimasukkan ke dalam freezer selama \pm 1 jam.

5. Tahap Sectioning (pemotongan)

Pada tahapan ini, pankreas yang sudah mengeras dilepaskan dari kaset dan dipasang pada mikrotom kemudian dipotong setebal 5 micron dengan pisau

mikrotom. Hasil potongan dimasukkan ke dalam water bath bersuhu 40°C untuk merentangkan hasil potongan, hasil potongan kemudian diambil dengan object glass dengan posisi tegak lurus dan dikeringkan.

6. Tahap Staining (Pewarnaan)

Hasil potongan diwarnai dengan hematoxilin eosin (pewarnaan HE) melalui tahapan sebagai berikut : Preparat direndam dalam larutan xylene I selama 10 menit, xylene II selama 5 menit, ethanol absolut selama 5 menit, ethanol 96 % selama 30 detik, ethanol 50% selama 30 detik, dalam running tap water selama 5 menit, meyer hematoshirin selama 1-5 menit, dalam running tap water selama 2-3 menit.

Preparat diambil dari running tap water kemudian direndam dalam pewarna eosin selama 1-5 menit, dimasukkan dalam ethanol 75 % selama 5 detik, ethanol absolute selama 5 detik diulang 3 kali pada ethanol absolut yang berbeda. Preparat diambil dan direndam dalam xylene selama 5 menit, kemudian dipindahkan dalam xylene selama 5 menit dan terakhir dipindahlan ke dalam xylene selama 10 menit. Preparat diangkat dan dikeringkan. Preparat ditutup menggunakan deckglass. Preparat diamati melalui mikroskop binokuler Nikon E 100 untuk menghitung kerusakan pankreas.

3.6.9 Pengukuran Kadar *Super Oksida Dismutase* (SOD)

Superoxide dismutasi (SOD), diambil 10 mg organ dihomogenkan, ditambahkan 1 ml PBS, ditampung di opendof, ditambah Xerotine 100 µl, Xerotine Oksidase 100 µl, NBT 100 µl, diinkubasi T 30°C sebelum 30 menit, di

sentrifuge 3500 rpm selama 10 menit, diambil supernatan, ditambahkan PBS 3500 ml, di spektro menggunakan amaks (500-600 nm).

3.7 Pengukuran Kadar *Malondialdehid* (MDA)

malondialdehid (MDA), diambil 10 mg organ dihomogenkan, ditambah 1 ml aquades, ditampung dalam opendof, ditambah TCA 100% 100 μ l, Na Thio 1% 100 μ l, HCL 250 μ l, dipanaskan T 100°C selama 20 menit, disentrifuge 3500 rpm selama 10 menit, diambil supernatan, ditambahkan aquades 3500 μ l, dispektro menggunakan amaks (500-600 nm).

3.8 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian bentuk sediaan pegagan *Centella asiatica* (L.) Urban, terhadap gambaran histologis pankreas tikus, dilakukan dengan menggunakan metode lapang pandang. Untuk mengetahui derajat insulitis dilakukan melalui penghitungan kerusakan pulau Langerhans pada tiga luas bidang pandang setiap satu ekor tikus. Perhitungan ini dilakukan dengan cara memprosentase jumlah kerusakan dengan menggunakan millimeter block dan data yang didapat kemudian dianalisis menggunakan *Two Way Anova* Apabila $F_{hitung} > F_{tabel}$ 1%, maka H_0 ditolak. Apabila terjadi perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji BNJ dengan taraf signifikansi 1% untuk mengetahui perbedaan nekrosis pankreas tikus dari tiap kelompok perlakuan. Cara menghitung persentase kerusakan pankreas:

$$x = \frac{\text{jumlah kerusakan}}{\text{luas P.Langerhans}} \times 100\%$$