

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri atas dua faktor. Kedua faktor yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Faktor I dalam penelitian ini adalah bentuk sediaan pegagan yang terdiri dari 5 level, yaitu: tikus normal/tanpa perlakuan, tikus yang diinduksi aloksan dan diberi perlakuan ekstrak pegagan dengan dosis 300mg/kg BB, tikus yang diinduksi aloksan dan diberi perlakuan pegagan segar dengan dosis 0,2g/kg BB, tikus yang diinduksi aloksan dan diberi perlakuan air rebusan pegagan dengan dosis 0,64ml/kg BB, tikus yang diinduksi aloksan tanpa pemberian perlakuan pegagan). Faktor II adalah lama pemberian sediaan yang terdiri dari 2 level, yaitu: lama pemberian 28 hari dan lama pemberian 42 hari

Dari kedua faktor yang telah diuraikan didapatkan 10 kombinasi perlakuan. Setiap perlakuan diulangi 3 kali:

1. Kelompok I (kontrol -1) : Tikus tanpa perlakuan dan diuji daya ingatnya pada hari ke 21 dan 28.
2. Kelompok I (kontrol -2) : Tikus tanpa perlakuan dan diuji daya ingatnya pada hari ke 35 dan 42.
3. Kelompok II: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi ekstrak pegagan dengan dosis 300 mg/kg BB per hari selama 28 hari.

4. Kelompok II: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi ekstrak pegagan dengan dosis 300 mg/kg BB per hari selama 42 hari.
5. Kelompok III: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi daun pegagan segar sebanyak 0,2 gram/kg BB per hari selama 28 hari.
6. Kelompok III: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi daun pegagan segar sebanyak 0,2 gram/kg BB per hari selama 42 hari.
7. Kelompok IV: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi air rebusan daun pegagan sebanyak 0,64 ml/kg BB per hari selama 28 hari
8. Kelompok IV: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi air rebusan daun pegagan sebanyak 0,64 ml/kg BB per hari selama 42 hari.
9. Kelompok V (kontrol +2): Tikus diinduksi dengan aloksan tanpa pemberian pegagan dan diuji daya ingatnya pada hari ke 21 dan 28.
10. Kelompok V (kontrol +2): Tikus diinduksi dengan aloksan tanpa pemberian pegagan dan diuji daya ingatnya pada hari ke 21 dan 28.

### **3.2 Variabel Penelitian**

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel bebas : bentuk sediaan berupa: (tikus normal/tanpa perlakuan, tikus yang diinduksi aloksan dan diberi perlakuan ekstrak pegagan dengan dosisi 300mg/kg BB, tikus yang diinduksi aloksan dan diberi perlakuan pegagan segar dengan dosis 0,2g/kg BB, tikus yang diinduksi aloksan dan diberi perlakuan air rebusan pegagan dengan dosis 0,64ml/kg BB, dan tikus yang diinduksi aloksan tanpa pemberiaan perlakuan pegagan).

2. Variabel tergantung : kemampuan tikus untuk mengingat kembali ruang terang dan gelap.
3. Variabel Terkontrol : Jenis hewan uji coba yaitu tikus putih strain wistar, jenis kelamin betina, kandang atau bak plastik dengan alas sekam, pakan tikus dan air minum.

### **3.3 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli - November 2011 di Laboratorium Biologi Sistematis, jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

### **3.4 Populasi dan Sampel**

Hewan uji yang dipakai adalah tikus putih strain wistar dengan jenis kelamin betina, umur 4 bulan dengan berat badan rata-rata 200-250 gram sebanyak 30 ekor 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 5 ml, timbangan analitik, corong buchner, perangkat *rotary evaporator vacuum*, hot

plate, pipet tetes, mikroskop, cover glass, objek glass, cutton buds, dan alat uji menghindar pasif modifikasi dari Jarvik.

### **3.5.2 Bahan**

Bahan yang digunakan adalah serbuk daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) diperoleh dari Balai Materia Medika Batu, pegagan segar, pelet, air sumur, Na CMC 0,5%, giemsa, hormon prostaglandin, aloksan, dan skopolamin.

## **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 2 minggu kemudian dibagi menjadi beberapa kelompok yang terdiri atas kontrol (tikus normal tidak mengalami nekrosis neuron otak) dan kelompok perlakuan yaitu tikus yang mengalami nekrosis neuron otak.

### **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 Otak**

Untuk membuat tikus mengalami nekrosis neuron otak, maka tikus diinduksi menjadi diabetes kronis dengan cara diinduksi aloksan secara intravena sebanyak 2 kali dengan dosis 65 mg/kg BB. Untuk 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 aloksan dengan dosis 65 mg/kg BB. Abnormalitas insulin dan kadar insulin dan kadar gula darah di pembuluh darah pada penderita diabetes dapat meningkatkan resiko terjadinya kerusakan otak (Swansom, 2006).

Untuk mengetahui kurun waktu kerusakan neuron otak 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). Pada penelitian ini tikus yang telah diinduksi aloksan dibiarkan selama 6 minggu untuk menunggu terjadinya nekrosis otak. Diperkirakan dalam kurun waktu 6 minggu sudah terjadi kerusakan mikrovaskular yang menyebabkan terjadinya nekrosis akut pada neuron otak karena kerusakan mikrovaskular pada manusia terjadi dalam kurun waktu 10-15 tahun.

### **3.6.4 Pembuatan Bentuk Sediaan Pegagan**

#### **3.6.4.1 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 bunchner. Filtrat yang

diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental (Gupta, 2003). Ekstrak kental yang dihasilkan selanjutnya disimpan dan digunakan untuk perlakuan. Ekstrak kental tersebut agar bisa diberikan pada hewan coba dilarutkan terlebih dahulu dengan 0,5 ml Na CMC 0,5% sebagai surfaktan.

#### **3.6.4.2 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 (Mardisiswoyo, 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.

#### **1.6.4.3 Daun Segar Pegagan**

Pengkonsumsian daun pegagan segar berdasarkan jumlah konsumsi lalapan segar daun pegagan oleh masyarakat Jawa yaitu dalam sehari kira-kira 70 g daun pegagan (Wijayakusuma, 2006). 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.

#### **3.6.5 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.

### **3.6.6 Kegiatan Perlakuan**

Beberapa bentuk sediaan pegagan diberikan pada tikus betina secara oral 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 20 dan hari ke 34 dilakukan uji daya ingat dengan alat uji menghindar pasif, setelah diuji tikus diberi skopolamin dan 24 jam kemudian dilakukan uji retensi 1 dan pada hari ke 28 dan 42 dilakukan uji retensi 2.

### **3.6.7 Pengamatan Kemampuan Kognitif Mengingat**

Untuk mengukur perilaku belajar dan mengingat dari semua tikus digunakan alat uji menghindar pasif modifikasi dari Jarvik. Alat ini terdiri dari 2 ruangan, ruang kecil dan ruang besar. Ruang kecil ( $25 \times 15$  cm) transparan dan diterangi dengan lampu 25 Watt setinggi 50 cm dari lantai berkawat yang disusun paralel. Ruang besar berupa kamar gelap berukuran  $50 \times 50 \times 50$  cm yang berlantai dari anyaman kawat paralel berjarak 1 cm antar sesamanya yang dialiri arus listrik 5 mA. Kedua ruangan dihubungkan dengan sebuah pintu kecil (10 cm tinggi, 7,5 cm lebar). Tikus yang akan diukur perilakunya diletakkan dalam ruangan kecil dan secara pasif diharapkan akan memasuki kamar gelap lewat pintu penghubung dan segera setelah masuk ke kamar gelap kakinya dikejutkan dengan arus listrik lemah yang dialirkan ke lantainya.

Pengukuran terdiri dari *learning trial* (LT) atau uji belajar dan *retention trial* (RT) atau uji retensi. Waktu antara uji belajar dan uji retensi adalah 24 jam, yang menggambarkan kemampuan mengingat jangka pendek dari objek. Waktu yang dibutuhkan oleh sampel mulai dari ruang kecil, lalu masuk ke dalam ruang gelap dicatat, kemudian diberi aliran listrik pada kakinya secara terkejut 1 kali 10 detik. Kemudian diberi suntikan skopolamin secara intraperitoneal lalu dimasukkan ke dalam kandang. Setelah 24 jam dilakukan uji RT 1 dan RT 2 dilakukan pada hari ke 7 setelah RT 1.

Lama retensi, yaitu selisih waktu belajar dan waktu retensi diasumsikan sebagai kemampuan belajar dan mengingat Waktu maksimal dalam pengukuran ini adalah 600 detik. Kriteria kemampuan mengingat dengan baik bila pada uji retensi subjek belum memasuki kamar gelap selama 600 detik. Subjek dinyatakan mempunyai kemampuan mengingat dengan baik bila  $RT - LT > 0$ .

### **3.7 Analisa Data**

Untuk mengetahui pengaruh bentuk sediaan pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap kemampuan tikus (*Rattus norvegicus*) untuk mengingat kembali kejadian di ruang gelap dan terang, dilakukan analisis *Two Way Anova*. Jika  $F_{hitung} > F_{tabel}$  1%, maka  $H_0$  ditolak. Apabila terjadi perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji BNJ dengan taraf signifikansi 1%.