

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang Pengaruh Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Terhadap Kadar Antioksidan SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) dan KADAR GLUTATHION SUPEROKSIDA HIDROKSIL (GSH) pada Ovarium Mencit (*Mus musculus*) merupakan penelitian eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan yaitu mencit kontrol (tanpa perlakuan) dan mencit dengan perlakuan ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dengan 4 dosis yang berbeda.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas 3 variabel. Variabel bebas dalam penelitian ini yakni berupa ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban), yang dibuat dalam 4 dosis berbeda, yaitu: 125 mg/Kg BB, 200 mg/Kg BB, 275 mg/Kg BB dan 350 mg/Kg BB; yang termasuk variabel terikat pada penelitian ini ialah efektifitas antioksidan dari ekstrak daun pegagan terhadap ovarium mencit (*Mus musculus*), sedangkan variabel terkontrol adalah mencit (*Mus musculus*) betina fertil galur Balb/c yang diberi makan pelet dan diberi minum secara *ad libitum*.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai Desember 2012. Bertempat di Laboratorium Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan untuk pengujian kadar SOD dan GSH dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang Jawa Timur.

3.4 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa mencit (*Mus musculus*) betina berumur $\pm$ 4 bulan, dengan berat 13-26 gram dari galur Balb/c. Sampel yang digunakan adalah 25 ekor mencit (*Mus musculus*) betina yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor mencit (*Mus musculus*) betina sebagai ulangan.

1.5 Alat dan Bahan Penelitian

1.5.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya; Kandang pemeliharaan mencit, tempat makan mencit, tempat minum mencit, cotton bud, timbangan analitik, mikropipet, obyek glass, mikroskop binokuler Nikon E 100, sonde lambung bayi, corong buchner, perangkat rotary evaporator vacuum, labu ukur 100 ml, gelas ukur 10 ml, beaker glass 50 ml, beaker glass 500 ml, spatula, hot plate, papan seksi, seperangkat alat bedah, spuit insulin 1 ml, aluminium foil, plastic wrap,

botol 10 ml, tissue, sarung tangan, vortex, tube, inkubator, spektrofotometri, dan sentrifuge.

1.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya mencit (*Mus musculus*) fertil galur Balb/c dari Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada, sekam, pelet, air sumur, simplisia daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) diperoleh dari Balai Materia Medika Batu, etanol 70 %, NaCMC, Spuit 1 ml, PGF2 α (merek dagang Lutalyse buatan Pfizer Australia diperoleh dari Lokal Penelitian Sapi Potong Grati Pasuruan), NaCL fisiologis 0,9 %, PBS, xantine, Xantine Oxidase, PCA (Perchloric Acid, 6 N), Glutation Assay Buffer, dan OPA (0-phthalal dehyde).

3.6 Kegiatan Penelitian

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba mulai diaklimatisasi 1 bulan sebelum perlakuan pada suhu kamar (20-25°C). Selama proses aklimatisasi ini mencit diberi makan pelet dan diberi minum secara *ad libitum*.

3.6.2 Pembagian Kelompok Sampel

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit sebagai ulangan. Kelompok perlakuan dibagi sebagai berikut:

- a. Kelompok I (kontrol) : Mencit yang diberikan 0,5 ml Na CMC 0,5%.

- b. Kelompok II : Mencit yang diberi perlakuan ekstrak pegagan dengan dosis 125 mg/kg BB + 0,5 ml Na CMC 0,5%.
- c. Kelompok III : Mencit yang diberi perlakuan ekstrak pegagan dengan dosis 200 mg/kg BB + 0,5 ml Na CMC 0,5%.
- d. Kelompok IV : Mencit yang diberi perlakuan ekstrak pegagan dengan dosis 275 mg/kg BB + 0,5 ml Na CMC 0,5%.
- e. Kelompok IV : Mencit yang diberi perlakuan ekstrak pegagan dengan dosis 350 mg/kg BB + 0,5 ml Na CMC 0,5%.

3.6.3 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dilakukan dengan melalui tahapan sebagai berikut:

1. Serbuk daun pegagan yang telah halus dimaserasi dengan pelarut ethanol 70% selama 24 jam sambil diaduk setiap satu jam.
2. Serbuk yang telah dimaserasi disaring dengan corong bunchner.
3. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental.
4. Ekstrak kental yang dihasilkan selanjutnya disimpan dan digunakan untuk perlakuan.

3.6.4 Pembuatan Sediaan Larutan Na CMC 0,5%

Sediaan larutan Na CMC 0,5% dibuat dengan menambahkan 500 mg Na CMC kedalam 10 ml aquadest panas, kemudian diaduk selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai

gel serta homogen. Selanjutnya larutan diencerkan dalam labu ukur dengan aquades hingga volume 100 ml.

3.6.5 Penyerentakan Siklus Birahi

Sebelum diberikan perlakuan maka perlu dilakukan penyerentakan birahi. Hal ini dilakukan karena hewan coba yang digunakan berjenis kelamin betina yang cenderung dipengaruhi oleh siklus birahi. Penyerentakan dilakukan dengan pemberian injeksi hormon prostaglandin 0,5 mg yang diinjeksikan secara intramuskular sebanyak 0,1 ml hormon prostaglandin.

3.6.6 Penentuan Fase

Penentuan fase estrus dilakukan dengan terlebih dahulu mempersiapkan cotton buds, objek glass, dan mikroskop yang akan digunakan untuk melihat apusan vagina. Tahapan yang pertama adalah memasukkan cotton buds ke lubang vagina untuk mendapatkan lendir, kemudian meletakkan lendir tersebut ke objek glass. Setelah didapati lendir kemudian dilakukan pemeriksaan apusan vagina dengan mikroskop.

3.6.7 Pemberian Perlakuan

Ekstrak pegagan diberikan pada mencit betina fertil secara oral atau diberikan secara langsung dengan cara dicekok menggunakan sonde lambung bayi setelah 3 hari injeksi hormon prostaglandin. Pemberian ekstrak dilakukan selama 30 hari dengan menimbang ekstrak kental sesuai dosis yang telah ditentukan dan diencerkan dengan larutan Na CMC 0,5% sebanyak 0,5ml agar tidak melebihi kapasitas gastrik mencit.

3.6.8 Pengambilan sampel untuk pengamatan kadar antioksidan pada ovarium mencit (*Mus musculus*) betina

Pembedahan dilakukan setelah 30 hari masa perlakuan dengan langkah sebagai berikut :

1. Hewan coba dianastesi secara inhalasi dengan menggunakan kloroform.
2. Dilakukan pembedahan secara vertikal dari daerah abdomen posterior menuju anterior dengan membuka daerah rongga perut dan rongga dada.
3. Ovarium kemudian dipisahkan dan diletakkan dalam cawan petri yang berisi PBS.
4. Ovarium dicuci dengan cairan normal salin dingin (pH 7,4)
5. Dilakukan pengukuran SOD dan GSH.

3.6.9 Pengujian enzimatik

3.6.9.1 Pengujian *Superoxid Dismutase* (SOD)

1. Pembuatan reagen SOD (*Superoxid Dismutase*)
2. Disiapkan PBS (Buffer Salin)
3. Ovarium digerus dengan menggunakan mortal hingga halus, kemudian ditambahkan PBS sesuai dengan berat ovarium
4. Sampel kemudian divortex
5. Dimasukkan PBS kedalam tube, kemudian di tambahkan Xantine dan Xantine Oxidase
6. Sampel kemudian divorteks sampai sampel homogen

7. Sampel yang telah homogen diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 30°C
8. Sampel yang telah di inkubasi kemudian diambil supernatantnya
9. Tahapan selanjutnya yakni pengukuran dengan menggunakan spektrofotometri UV-160 pada kecepatan maksimum (580 nm)
10. Absorbsin sampel kemudian dibandingkan dengan sampel kosong (Blank) yang berupa PBS tanpa homogenat ovarium.

3.6.9.2 Pengujian Glutathion tereduksi (GSH)

1. Dipersiapkan larutan homogenat ovarium (sampel)
2. Diambil tube kosong, yang kemudian dimasukkan PCA (Perchloric Acid, 6 N) 20 ml
3. Ditambahkan dengan Glutathion Assay Buffer sebanyak 100 ml
4. Ditambahkan larutan homogenat (sampel) sebanyak 60 ml
5. Disentrifuge
6. Disiapkan tube kosong, kemudian di isi dengan larutan OPA Probe (O-phythalaldehyde)
7. Ditambahkan larutan homogenate yang telah di sentrifuge sebanyak 10 ml
8. Dishaker selama 40 menit
9. Absorbansinya kemudian dibaca dengan menggunakan ELISA Reader pada panjang gelombang 412 nm selama 15 menit

3.6.10 Pembuatan Preparat Histologi

Pembuatan preparat histologi ovarium dilakukan dengan langkah sebagai berikut :

1. Tahap Fiksasi. Pada tahap ini, ovarium difiksasi pada larutan formalin 10% selama 1 jam, diulang sebanyak 2 kali pada larutan yang berbeda
2. Tahap Dehidrasi. Pada tahap ini, ovarium 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, ovarium yang telah didehidratasi kemudian diclearing untuk menarik kadar ethanol dengan menggunakan larutan xylene I selama 1,5 jam dan dilanjutkan ke larutan xylene II selama 1,5 jam.
4. Tahap Embedding. Pada tahapan ini, ovarium dimasukkan kedalam kaset dan diinfiltrasi dengan menuangkan paraffin yang dicairkan pada suhu 60oC, kemudian parafin dibiarkan mengeras dan dimasukkan ke dalam freezer selama ± 1 jam.
5. Tahap Sectioning (pemotongan). Pada tahapan ini, ovarium 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 40oC 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 hematoxylin eosin (pewarnaan HE) melalui tahapan sebagai berikut :

- a. Preparat direndam dalam larutan xylene I selama 10 menit.
- b. Preparat diambil dari xylene I dan direndam dalam larutan xylene II selama 5 menit
- c. Preparat diambil dari xylene II dan direndam dalam ethanol absolut selama 5 menit
- d. Preparat diambil dari ethanol absolut dan direndam dalam ethanol 96 % selama 30 detik
- e. Preparat diambil dari ethanol 96% dan direndam dalam ethanol 50% selama 30 detik
- f. Preparat diambil dari ethanol 50% dan direndam dalam running tap water selama 5 menit
- g. Preparat diambil dari running tap water dan direndam dalam meyer hematoshirin selama 1-5 menit
- h. Preparat diambil dari larutan meyer dan direndam dalam running tap water selama 2-3 menit
- i. Preparat diambil dari running tap water dan direndam dalam pewarna eosin selama 1-5 menit
- j. Preparat diambil dari larutan eosin kemudian dimasukkan dalam ethanol 75 % selama 5 detik, kemudian dimasukkan ke dalam

ethanol absolute selama 5 detik diulang 3 kali pada ethanol absolut yang berbeda

- k. Preparat diambil dan direndam dalam xylene III selama 5 menit, kemudian dipindahkan dalam xylene IV selama 5 menit dan terakhir dipindahkan ke dalam xylene V selama 10 menit
- l. Preparat diangkat dan dikeringkan
- m. Preparat ditutup menggunakan deckglass

3.6.9 Pengamatan Preparat Ovarium

Sediaan mikroanatomi ovarium mencit diamati di bawah mikroskop komputer binokuler Nikon E 100 dengan perbesaran 400 kali (10x40) yang kemudian langsung difoto.

Pengambilan gambar histologi sel dilakukan dengan menggunakan mikroskop komputer. Pengambilan gambar dilakukan dengan lima sudut pandang pada setiap perlakuan yakni pada sisi kanan, sisi kiri, atas, bawah dan tengah. Masing-masing gambar kemudian di ukur ketebalan sel pada empat sisinya berbeda yakni sisi kanan, sisi kiri, atas dan bawah. Gambaran histologi sel terdiri dari sel folikel primer, folikel sekunder dan folikel tersier.

Pengamatan ketebalan sel pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui seberapa besar tingkat kerusakan yang terjadi pada sel ovarium mencit akibat pemberian ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban). Kerusakan sel pada penelitian ini ditunjukkan dengan adanya

penurunan ketebalan sel . Semakin tipis gambaran histologi sel maka semakin besar pula tingkat kerusakan sel granulose dalam ovarium, sedangkan semakin tebal gambaran histologi sel maka semakin kecil pula kerusakan yang terjadi.

3.7 Analisis Data

Jumlah hasil pengujian kadar SOD dan GSH yang telah dihitung dianalisis menggunakan uji ANAVA One Way. Apabila terdapat beda nyata maka dilakukan uji lanjut dengan BNT 0,05, hal ini dilakukan agar adapat diketahui pengaruh beda nyata terkecil di setiap perlakuan dari masing-masing pengamatan baik SOD maupun GSH.