

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian pengaruh pemberian ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap perkembangan folikel ovarium mencit (*Mus musculus*) ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah kontrol (tanpa perlakuan) dan mencit yang diberi ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dengan 4 dosis yang berbeda.

#### **3.2 Variabel Penelitian**

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yang meliputi : 1) variabel bebas, 2) variabel terikat dan 3) variabel terkontrol. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban), yang dibuat dalam 4 dosis, yaitu : 125 mg/kg bb, 200 mg/kg bb, 275 mg/kg bb, dan 350 mg/kg bb; yang termasuk variabel terikat yang digunakan adalah jumlah folikel primer, sekunder, tertier, de Graaf, korpus luteum, tebal sel teka dan berat ovarium mencit; sedangkan variabel terkontrol adalah mencit (*Mus musculus*) betina fertil strain Balb/c yang diberi makan pelet dan diberi minum secara ad libitum.

### 3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober sampai Desember 2012 di Laboratorium Biosistematik, Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

### 3.4 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) yang berumur  $\pm$  4 bulan, berat badan 20-30 gram dan jenis kelamin betina dari strain Balb/c. Perkiraan besar sampel yang digunakan adalah sekitar 25 ekor mencit yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor mencit sebagai ulangan.

### 3.5 Alat dan Bahan

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 bunchner, perangkat rotary evaporator vacum, labu ukur 100 ml, gelas ukur 10 ml, beaker glass 50 ml, beaker glass 500 ml, Erlenmeyer 500 ml, pengaduk gelas, hot plate, corong gelas, pipet tetes, dissecting set, papan seksi, botol, objek glass, deck glass, kaset cetakan, tissue processor, tissue embedding, microtome, water bath, Mikroskop binokuler Nikon E 100.

Bahan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) betina fertil strain DDY diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajahmada Yogyakarta , pelet, air sumur, serbuk daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) diperoleh dari Balai Materia Medika Batu, Preparat hormon

Prostaglandin (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) merek dagang Lutalyse buatan Pfizer Australia diperoleh dari Loka Penelitian Sapi Potong Grati Pasuruan, Na CMC, aquades, cloroform, formalin 10%, ethanol 70%, parafin, running tap water, xylene, meyer hematoshirine dan eosin stain.

### **3.6 Kegiatan Penelitian**

#### **3.6.1 Persiapan Hewan Coba**

Hewan coba mulai dikandangkan 2 minggu sebelum perlakuan untuk proses aklimatisasi 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 V : Mencit yang diberi perlakuan ekstrak pegagan dengan dosis 300 mg/kg bb + 0,5 ml Na CMC 0,5%

### 3.6.3 Pembuatan Ekstrak

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

1. Serbuk daun pegagan yang telah halus dimaserasi dengan pelarut ethanol 70% selama 24 jam sampai 3 hari sambil sesekali diaduk
2. Setiap 24 jam ekstrak disaring dengan corong bunchner. Penyaringan dilakukan sebanyak 3 sampai 5 kali
3. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator suhu 40°C sampai pelarut menguap sehingga diperoleh ekstrak kental
4. Ekstrak kental yang dihasilkan selanjutnya disimpan dan digunakan untuk perlakuan

### 3.6.4 Pembuatan Sediaan Larutan Na CMC 0,5%

Pembuatan sediaan larutan Na CMC 0,5% dibuat dengan menimbang 500 mg Na CMC. Setelah itu memanaskan aquades sebanyak 100 ml dan menaburkan Na CMC pada aquades panas tersebut. Na CMC dibirakan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai jeli . selanjutnya diaduk sampai homogen, kemudian diencerkan dengan dimasukkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan 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

memberikan preparat hormon prostaglandin sebanyak 0,1 mg yang diinjeksikan secara intramuskular.

### **3.6.6 Pemberian Perlakuan**

Ekstrak pegagan diberikan pada betina fertil secara oral 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.

### **3.6.7 Pengambilan Sampel**

Pembedahan dilakukan pada hari ke 31 masa perlakuan dengan langkah sebagai berikut :

1. Hewan coba dianastesi secara inhalasi dengan menggunakan cloroform
2. Dilakukan pembedahan secara vertikal dari daerah abdomen posterior menuju anterior dengan membuka daerah rongga perut dan rongga dada.
3. Ovarium sebelah kanan dan kiri ditimbang dengan timbangan analitik untuk mengetahui berat ovarium yang selanjutnya dipisahkan dan difiksasi dalam larutan formalin 10%
4. Hasil yang diperoleh kemudian dikelompokkan berdasarkan kelompok perlakuan.

### 3.6.8 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 60°C, kemudian parafin dibiarkan mengeras dan dimasukkan ke dalam freezer selama  $\pm 1$  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 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 :

- 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 etanol absolut selama 5 menit
- d) Preparat diambil dari etanol absolut dan direndam dalam etanol 96 % selama 30 detik
- e) Preparat diambil dari etanol 96% dan direndam dalam etanol 50% selama 30 detik
- f) Preparat diambil dari etanol 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 etanol 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 binokuler Nikon E 100 dengan perbesaran 400 kali (10x40) dan difoto. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) dilakukan melalui penghitungan jumlah folikel primer, jumlah folikel sekunder, jumlah folikel tertier, jumlah folikel de graff, jumlah korpus luteum dan ketebalan sel teka melalui luas 5 lapang pandang dalam setiap preparat. Ovarium dibersihkan dari lemak-lemak yang menempel pada ovarium kemudian ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik.

### **3.7 Analisis Data**

Jumlah folikel primer, jumlah folikel sekunder, jumlah folikel tertier, jumlah folikel de Graff , jumlah korpus luteum, tebal sel teka dan berat ovarium yang telah dihitung dianalisis menggunakan uji ANAVA tunggal. Apabila  $F_{hitung} \geq F_{tabel}$  maka dilakukan uji lanjut dengan BNT 5%.