

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret – April 2017 di Laboratorium Biologi Universitas Islam Negeri Malang dan Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya untuk tempat hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*), Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya untuk pengukuran MDA, Unit Pelaksanaan Teknis (UPT) Materia Medica Batu untuk pembuatan ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness), dan Laboratorium Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya untuk pembuatan dan pembacaan preparat histopatologi organ jejunum.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan selama melakukan penelitian, antara lain tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *wistar*, LPS *Escherichia-coli* (Sigma-aldrich 0111 B4), *Paraformaldehyde Acid* (PFA), standar MDA, TCA 100%, HCl, Na-Thio 1%, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), *Aquadest*, NaCl fisiologi, etil asetat, methanol, n-heksana, pakan standart (pellet ayam), air minum hewan coba (air PDAM[®]), alkohol bertingkat (60%, 70%, 80% dan 96%), alkohol absolut, xilol, parafin, *chloroform*, dan pewarna histologi HE.

4.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain *disposable syringe* 1 mL, *disposable syringe* 5 mL, kandang hewan coba,

scalpel, gunting, gelas objek, mortar, *vortex*, *water bath* 100°C, *blender*, *beaker glass*, *aluminium foil*, spektrofotometer (*Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*), tabung ependorf (mikrotube), dan Mikroskop Olympus BX51.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *wistar* jantan, berat badan 150-200 g, berumur 8–12 minggu (Setiomulya, 2016), yang didapatkan dari PUSVETMA – Surabaya.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Model eksperimental yang dipakai, yaitu *Post test only control group design*. Rancangan kelompok penelitian dapat dilihat pada **Table 4.1**.

Tabel 4.1. Rancangan Kelompok Penelitian.

Kelompok	Keterangan
K -	Kelompok hewan sehat tanpa diinjeksi LPS E-coli dan tanpa preventif ekstrak sambiloto
K +	Kelompok hewan yang diinjeksi LPS dengan dosis 2 mg/kg BB pada hari ke-15 perlakuan penelitian
P1	Kelompok hewan diberi ekstrak daun sambiloto 250 mg/ kg BB selama 8 hari dan diinjeksi LPS 2 mg/kg BB pada hari ke-15 perlakuan penelitian
P2	Kelompok hewan diberi ekstrak daun sambiloto 500 mg/ kg BB selama 8 hari dan diinjeksi LPS 2 mg/kg BB pada hari ke-15 perlakuan penelitian
P3	Kelompok hewan diberi ekstrak daun sambiloto 1000 mg/ kg BB selama 8 hari dan diinjeksi LPS 2 mg/kg BB pada hari ke-15 perlakuan penelitian

Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$\begin{aligned}
 t(n-1) &\geq 15 \\
 5(n-1) &\geq 15 \\
 5n-5 &\geq 15 \\
 5n &\geq 20 \\
 n &\geq 20/5 \\
 n &\geq 4
 \end{aligned}$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga total hewan coba yang dibutuhkan adalah 20 ekor.

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini, yaitu :

- Variabel bebas : Dosis Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) 250 mg/ kg BB, 500 mg/ kg BB, 1000 mg/ kg BB dan LPS *Escherichia-coli* 2 mg/kg BB
- Variabel tergantung : Kadar MDA dan gambaran histopatologi jejunum
- Variabel kontrol : Homogenitas tikus putih (*Rattus norvegicus*): galur wistar, jenis kelamin, umur, berat badan, lingkungan, suhu kandang, pakan, dan air minum.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1. Preparasi Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*)

Hewan coba dipersiapkan dan dimulai dengan diaklimatisasi selama tujuh hari di laboratorium. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dibagi 5 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) dan diberikan pakan standart yang mengandung karbohidrat, lemak 4 %, protein 21 %, serat 4,5 %, kalsium 0,9-1,1 %, fosfor 0,7-0,9 % dan air 12 %. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dipelihara didalam kandang bak plastik berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm, yang dilengkapi dengan penutup kawat. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) ditempatkan pada tempat yang tenang dan bebas dari polusi kendaraan dan industri. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi.

4.6.2 Pembuatan Hewan Model Sepsis

Lipopolisakarida (LPS) *Escherichia-coli* dari Sigma Aldrich sebanyak 10 mg dilarutkan kedalam 10 mL PBS. Untuk membuat hewan model sepsis

dilakukan induksi *intra-peritoneal* dengan LPS dosis 2 mg/kg BB tikus (Hui, *et al.*, 2014). Pemberian dilakukan satu kali pada pagi hari dengan dosis tersebut. Lipopolisakarida (LPS) diinjeksi pada hari ke-15 perlakuan penelitian *intra-peritoneal* untuk perlakuan K+, P1, P2, P3.

4.6.3 Pembuatan Ekstrak Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

Pembuatan ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) berdasarkan pada penelitian (Rais, 2012). Pertama, yaitu dilakukan proses preparasi seperti tahap penyiapan bahan baku dan ekstraksi. Pada tahap penyiapan, daun sambiloto dipilih, dibersihkan dari kotoran atau debu menggunakan air, dan dibilas dengan *aquadest*. Lalu dilakukan penirisan dan pengeringan untuk mengurangi kadar air dalam tanaman agar reaksi enzimatik dapat dihentikan, sehingga tidak mudah rusak. Daun sambiloto yang sudah kering dihaluskan dengan mesin *blender* hingga menjadi serbuk. Serbuk simplisia diayak dengan ayakan 20 mesh. Pada tahap ekstraksi dimulai dengan menimbang 100 g serbuk daun sambiloto. Dilakukan pembasahan serbuk dengan pelarut etanol 70% secukupnya. Serbuk daun sambiloto yang telah dibasahi dengan pelarut kemudian dimasukkan ke dalam toples, diratakan, dan diberi tambahan pelarut etanol 70% hingga serbuk terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat serbuk atau lebih). Toples ditutup dengan rapat selama 24 jam dan di *shaker* di atas *shaker* digital 50 rpm dengan tujuan untuk homogenisasi. Disaring ekstrak cair yang didapatkan dengan penyaring kain dan ditampung ekstrak ke dalam erlenmeyer. Dilakukan remaserasi sebanyak dua kali pada ampas dengan cara memasukkan kembali ke dalam toples dan ditambah pelarut sampai terendam (minimal 5 cm diatas

permukaan serbuk). Dibiarkan semalam (24 jam) dan *dishaker* kembali. Hasil ekstrak pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* selama dua jam, sehingga diperoleh ekstrak etanol daun sambiloto, kemudian disuspensikan kedalam aquades hingga 100 mL.

4.6.4 Pemberian Terapi Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

Penentuan dosis ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) berdasarkan penelitian Ulumiyah (2012)., yaitu sebesar 250 mg/Kg BB, 500 mg/Kg BB dan 1000 mg/Kg BB. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan dosis 250 mg/Kg BB, 500 mg/Kg BB dan 1000 mg/Kg BB sebagai dosis eksperimental tindakan preventif sepsis.

Terapi pemberian ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) diberikan pada hewan coba kelompok P(1), P(2) dan P(3). Dosis pemberian terapi pada kelompok P(1) sebesar 250 mg/kg BB, kelompok P(2) sebesar 500 mg/kg BB, dan kelompok P(3) sebesar 1000 mg/kg BB. Pemberian ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) diberikan *per-oral* delapan hari sebanyak sekali sehari pada pagi hari pada hari ke-8 sampai hari ke-15 perlakuan penelitian.

4.6.5 Perlakuan Penelitian

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok percobaan yaitu K-, K+, P1, P2, dan P3. Kelompok K+ adalah kelompok yang diinduksi LPS *intra-peritoneal* dengan dosis 2 mg/Kg BB pada hari ke-15 perlakuan penelitian. Kelompok P1 adalah kelompok yang diberi ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) 250 mg/ kg BB *per-oral* selama 8 hari dan diinduksi LPS *inta-peritoneal* dengan

dosis 2 mg/Kg BB pada hari ke-15 perlakuan penelitian. Kelompok P2 adalah kelompok yang diberi ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) 500 mg/kg BB peroral selama 8 hari dan diinduksi LPS *intra-peritoneal* dengan dosis 2 mg/Kg BB pada hari ke-15 perlakuan penelitian. Kelompok P3 adalah kelompok diberi ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) 1000 mg/Kg BB selama 8 hari dan diinduksi LPS *intra-peritoneal* dengan dosis 2 mg/Kg BB pada hari ke-15 perlakuan penelitian. Pada hari ke-22 tikus putih (*Rattus norvegicus*) dimatikan dengan cara *cervical dislocation* dan dibedah untuk diambil organ jejunum. Organ yang didapatkan dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% bertujuan untuk membersihkan darah.

4.6.6 Euthanasi Hewan Coba

Teknik *cervical dislocation* dengan menggunakan alat-alat yang tersedia secara komersial, amat praktis dilakukan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*), kelinci, dan spesies kecil lain, dilakukan dengan cara memisahkan tengkorak dan otak dari sumsum tulang belakang. Teknik untuk melakukan metode ini adalah dengan memberikan tekanan ke bagian posterior dasar tulang tengkorak dan sumsum tulang belakang. Apabila sumsum tulang belakang terpisah dari otak, refleks kedip menghilang dengan segera, rangsangan rasa sakit menghilang, sehingga hewan tidak peka rasa sakit (Isbagio, 1992). Pada penelitian ini hewan coba di euthanasia pada 7 hari setelah diinduksi LPS atau pada hari ke-22 penelitian.

4.6.7 Pembuatan Kurva Baku Malondialdehida (MDA)

Standar MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 mg/ml diambil 100 μ L, dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda, dan ditambahkan 550 μ L *aquadest*. Setiap tabung ditambahkan 100 μ L TCA 100%, 250 μ L HCl 1N, dan 100 μ L Na-Thio 1%, dihomogenkan dengan *vortex*. Tabung ditutup dengan plastik dan diberi lubang, diinkubasi dalam penangas air atau *water bath* dengan suhu 100°C selama 30 menit. Setelah itu, didinginkan pada suhu ruangan. Larutan standar dibaca menggunakan spektrofotometer (*Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*) (λ maks = 530 nm). Kurva standar MDA dihasilkan dari persamaan regresi antara absorbansi (y) dan konsentrasi MDA (x) (Barnes dkk., 1998).

4.6.8 Pengukuran Kadar Malondialdehida (MDA)

Organ jejunum sebanyak 0,225 g dipotong kecil-kecil, digerus pada mortar dingin, ditambahkan 500 μ L NaCl fisiologis 0,9%, homogenat dipindah kedalam ependorf, dan disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil 100 μ L dimasukkan kedalam ependorf yang lain, ditambah 550 μ L *aquadest*, 100 μ L TCA kemudian dihomogenkan dengan *vortex*, ditambahkan 250 μ L HCL 1N lalu lalu dihomogenkan dengan *vortex*. Kemudian ditambahkan dengan 100 μ L Na-Thio 1% dan dihomogenkan kembali dengan *vortex*. Setelah itu, ependorf menggunakan *plastix wrap* dan dipanaskan dalam *water bath* 100°C selama 30 menit. Setelah dipanaskan, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipindah kedalam ependorf baru. Sampel kemudian diukur

absorbansinya dengan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* pada panjang gelombang maksimum (530 nm) (Barnes dkk., 1998).

4.6.9 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi didasarkan atas perlakuan terhadap tikus yang telah dilakukan. Pembuatan preparat tikus K + dimulai dengan mematikan tikus setelah diberi LPS intraperitoneal pada hari ke-22 dengan cara dislokasi *os. cervicalis* leher, kemudian tikus dibedah dan diambil organ jejunum. Pada tikus yang mendapatkan perlakuan preventif didislokasi setelah 8 hari tindakan preventif diberikan. Sampel jejunum yang diperoleh, dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% bertujuan untuk menghilangkan darah. Proses pembuatan preparat histopatologi menurut Janquiera dan Carneiro (2007) terdiri dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, *embedding*, *sectioning*, penempelan digelas objek serta pewarnaan.

Fiksasi untuk mencegah kerusakan jaringan Tahapan fiksasi yaitu dengan memasukkan jaringan kedalam larutan PFA 10% selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan proses dehidrasi. Proses dehidrasi diawali dengan merendam jaringan dalam larutan etanol dengan konsentrasi beringkat mulai dari 70% selama 24 jam, kemudian didalam etanol 80% selama 2 jam, dilanjutkan etanol 90%, sampai absolut masing-masing membutuhkan waktu 20 menit.

Tahapan selanjutnya yaitu penjernihan, dengan cara jaringan dipindahkan dari alkohol absolut kedalam larutan penjernihan yaitu xylol I (20 menit), xylol II (30 menit). Kemudian dilanjutkan dengan proses infiltrasi dilakukan dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C.

Proses *embedding* dilakukan dengan mencelupkan jaringan dalam paraffin cair yang telah dituang ke dalam cetakan. Setelah beberapa saat paraffin akan memadat. Pembuatan preparat dilakukan dengan memasukkan hasil *embedding* pada penjepit (*block holder*). *Sectioning* diawali dengan mengatur ketebalan irisan dengan ukuran $\pm 4-5 \mu\text{m}$ dengan menggunakan mikrotom. Hasil irisan dipindahkan dengan kuas ke dalam air hangat 38-40°C untuk membuka lipatan dan meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan *object glass*. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan di atas *hot plate* 38-40°C sampai kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40 °C lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE.

Pewarnaan HE dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hemaktosilin eosin. Proses pewarnaan diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol kemudian dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan memasukkan preparat kedalam alkohol bertingkat konsentrasi alkohol yang digunakan 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama tiga menit. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dilanjutkan dengan merendam kedalam air *aquadest* selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna Hemaktosilin selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan kemudian dicuci dengan akuades selama 5 menit. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan menggunakan Eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan akuades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70 %, 80%, 90%, dan 95% masing-masing selama beberapa detik, dan dilanjutkan dengan alkohol absolut I, II, dan III masing-

masing 2 menit. Setelah itu dilanjutkan dengan proses *clearing* dengan xylol I, II, dan III selama 3 menit. Terakhir, dilakukan *mounting* (perekatan) menggunakan entellan serta ditutup menggunakan *coverglass* (Junquiera dan Carneiro, 2007).

Pengamatan histopatologi jejunum dilakukan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus BX-51). Pengamatan meliputi perubahan bentuk villi jejunum, infiltrasi sel radang, dan nekrosis jaringan dengan pembesaran 100x, 400x, dan 1000x.

4.7 Analisis Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah kadar MDA dan gambaran histopatologi jejunum. Kadar MDA dianalisa secara kuantitatif menggunakan analisis ragam *One-Way ANOVA* dan dilakukan uji lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf kepercayaan $\alpha = 5\%$. Gambaran histopatologi jejunum diamati secara kualitatif dengan melihat preparat histopatologi jejunum dibawah mikroskop cahaya perbesaran 100x, 400x, dan 1000x.