

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April – Mei 2017 di beberapa laboratorium antara lain:

- Perawatan, perlakuan dan euthanasia hewan coba akan dilakukan di Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang.
- Proses ekstraksi daun sambiloto dideterminasi dan dilakukan di UPT. Materia Medika Batu.
- Pengukuran aktivitas SOD plasma akan dilakukan di Laboratorium FAAL Fakultas Kedokteran UB.
- Pembuatan preparat histopatologi duodenum akan dilakukan di Laboratorium Kesima Patologi Anatomi RSI Aisyiah Malang.
- Pengamatan preparat histologi akan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam pemeliharaan hewan coba antara lain adalah kandang pemeliharaan beserta serutan kayu sebagai alasnya, lampu, tempat pakan dan minum tikus putih. Alat untuk persiapan pemberian ekstrak daun sambiloto adalah sonde lambung khusus tikus dan gelas ukur. Alat untuk injeksi LPS *E-coli* adalah *disposable syringe*. Pengambilan darah

menggunakan alat *disposable syringe*, tabung *venoject* tutup ungu, *ice box*, dan *sprayer* alkohol. Pengukuran kadar enzim SOD dengan *disposable syringe*, tabung *venoject* EDTA, mikropipet, sentrifus dan spektrofotometer. Alat untuk euthanasi hewan coba adalah papan bedah, *dissecting set* (peralatan bedah), sarung tangan (*glove*), dan masker. Alat untuk pembuatan dan pengamatan sediaan histopatologi duodenum adalah *object glass*, *cover glass*, mikrotom, dan mikroskop cahaya. Alat-alat penunjang lain yang dibutuhkan adalah kamera, lemari pendingin, dan peralatan tulis.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar*, LPS *E-Coli* (Sigma-Aldrich 0111:B4), ekstrak daun sambiloto, pelarut etanol 70%, alkohol 70%, dan akuades. Bahan yang dibutuhkan untuk mengukur kadar SOD plasma terdiri dari plasma darah, bufer natrium karbonat, bovine serum albumin (BSA), xantin, xantin oksida, dan NBT. Bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan preparat histopatologi duodenum antara lain *buffer formalin 4%*, alkohol bertingkat, alkohol absolute, larutan xilol, paraffin cair, dan pewarna hematoxylin-eosin (HE)

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan yaitu:

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.
2. Pembuatan sediaan, penentuan dosis dan pemberian preventif ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness).

3. Pemberian LPS *E-coli* pada hewan coba
4. Pengukuran kadar SOD plasma
5. Isolasi organ duodenum
6. Pembuatan dan pengamatan preparat histopatologi duodenum

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan Acak Lengkap digunakan apabila ragam satuan percobaan yang digunakan homogen atau seragam. Hewan model dibagi menjadi lima kelompok perlakuan dan masing-masing kelompok empat ulangan berdasarkan rumus menurut Montgomery *and* Kowalsky (2011) :

$$t (n-1) \geq 15$$

$$5 (n-1) \geq 15$$

$$5 n - 5 \geq 15$$

$$5 n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk lima kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal empat kali dalam setiap kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 20 ekor tikus. Lima kelompok perlakuan tersebut seperti pada **Tabel 4.1** yaitu kontrol positif (K+), kontrol negatif (K-), perlakuan 1, 2, dan 3. Kelompok kontrol positif (K+) merupakan tikus yang diinjeksi *LPS E-coli* secara intraperitoneal dengan dosis 2,0 mg/ kg

BB. Kelompok kontrol negatif (K-) merupakan tikus sehat yang tidak diberi perlakuan. Kelompok perlakuan 1 (P1) merupakan tikus yang diberi ekstrak daun sambiloto dengan dosis 250 mg/ kg BB pada hari ke-8 hingga ke-15 kemudian diinjeksi *LPS E-coli* secara intraperitoneal pada hari ke-15 dengan dosis 2,0 mg/ kg BB. Kelompok perlakuan 2 (P2) merupakan tikus yang diberi ekstrak daun sambiloto dengan dosis 500 mg/ kg BB pada hari ke-8 hingga ke-15 kemudian diinjeksi *LPS E-coli* secara intraperitoneal pada hari ke-15 dengan dosis 2,0 mg/ kg BB. Kelompok perlakuan 3 (P3) merupakan tikus yang diberi ekstrak daun sambiloto dengan dosis 1000 mg/ kg BB pada hari ke-8 hingga ke-15 kemudian diinjeksi *LPS E-coli* secara intraperitoneal pada hari ke-15 dengan dosis 2,0 mg/ kg BB. Tikus diberikan preventif ekstrak daun sambiloto sebanyak satu kali dalam sehari.

Tabel 4.1 Rancangan kelompok penelitian

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
Kelompok kontrol negatif (K-)	Tikus sehat (tanpa perlakuan)
Kelompok kontrol positif (K+)	Tikus dengan pemberian <i>LPS E-coli</i> dosis 2,0 mg/ kg BB (pada hari ke-15) secara intraperitoneal
Kelompok Perlakuan 1 (P1)	Pemberian ekstrak daun sambiloto dengan dosis 250 mg/ kg BB (pada hari ke-8 hingga ke-15) dan <i>LPS E-coli</i> 2,0 mg/ kg BB (pada hari ke-15)
Kelompok Perlakuan 2 (P2)	Pemberian ekstrak daun sambiloto

	dengan dosis 500 mg/ kg BB (pada hari ke-8 hingga ke-15) dan LPS <i>E-coli</i> 2,0 mg/ kg BB (pada hari ke-15)
Kelompok Perlakuan 3 (P3)	Pemberian ekstrak daun sambiloto dengan dosis 1000 mg/ kg BB (pada hari ke-8 hingga ke-15) dan LPS <i>E-coli</i> 2,0 mg/ kg BB (pada hari ke-15)

4.4.2 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini yaitu :

Variabel bebas : Dosis Ekstrak Daun Sambiloto dan LPS

Variabel tergantung : Aktivitas SOD dan histopatologi organ duodenum

Variabel kontrol : Tikus (*Rattus norvegicus*), jenis kelamin umur, berat badan, lingkungan, suhu, pakan.

4.4.3 Preparasi Hewan Coba (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dipersiapkan dan diadaptasi (aklimatisasi) selama tujuh hari untuk menyesuaikan kondisi laboratorium. Tikus putih dipelihara dalam kandang bak plastik berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm yang dilengkapi dengan penutup kawat dikandangkan dengan pakan dan minum ad libitum. Lokasi kandang dan tempat pemeliharaan bebas dari polusi kendaraan dan industri, dengan suhu 27°C. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus dan diberikan pakan berdasarkan dengan standar penyusunan ransum

untuk hewan coba *Association of Analytical Communities* (AOAC, 2005) yaitu ransum yang mengandung karbohidrat, lemak 3 %, protein 10%, mineral, vitamin dan air 12%.

4.4.4 Pembuatan Sediaan Lipopolisakarida (LPS) *E-coli*

Lipopolisakarida (LPS) *E-coli* dari Sigma Aldrich 0111: B4 sebanyak 10 mg dilarutkan kedalam 10 ml *Phosphat Buffer Saline* (PBS) steril. Sediaan LPS dengan PBS steril kemudian di campur dengan menggunakan vortex mixer agar membentuk larutan yang homogen dengan kecepatan 500 rpm selama 5 menit dan di simpan didalam freezer dengan suhu -4°C (Laboratorium Ilmu FAAL FK UB, 2017).

4.4.5. Pembuatan Hewan Model Sepsis

Injeksi sediaan LPS kedalam tubuh hewan coba tikus dilakukan secara intraperitoneal sebanyak satu kali pada hari ke-15. Dosis LPS yang digunakan adalah 2,0 mg/ kg BB (Qun Fu, 2014). Pemberian LPS ini diharapkan dapat menjadi radikal bebas didalam tubuh sehingga menyebabkan kondisi stress oksidatif dan terjadi sindroma sepsis.

4.4.6 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness)

Bahan baku daun sambiloto yang digunakan diperoleh dari UPT Materia Medika Batu. Pembuatan ekstrak daun sambiloto berdasarkan pada penelitian (Rais, 2012). Langkah awal yaitu dilakukan proses preparasi meliputi tahap penyiapan bahan baku dan ekstraksi. Pada tahap penyiapan, daun sambiloto yang digunakan dipilih dan dibersihkan dari kotoran atau

debu yang melekat menggunakan air lalu dibilas dengan akuades. Setelah itu dilakukan penirisan dan pengeringan untuk mengurangi kadar air dalam tanaman agar reaksi enzimatik dapat dihentikan sehingga tidak mudah rusak. Daun sambiloto yang telah kering dihaluskan dengan mesin blender hingga menjadi serbuk. Serbuk simplisia kemudian diayak dengan ayakan 20 mesh. Pada tahap ekstraksi dimulai dengan menimbang serbuk daun sambiloto sebanyak 100 gram. Kemudian 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 dishaker 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). Kemudian biarkan 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 ke dalam aquades hingga 100 mL.

4.4.7 Pemberian Preventif Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness)

Penentuan dosis ekstrak daun sambiloto berdasarkan penelitian Ulumiyah (2012), yaitu 250 mg/Kg BB, 500 mg/Kg BB, dan 1000 mg/Kg BB sebagai hepatoprotektor. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan dosis tersebut sebagai dosis eksperimental untuk preventif terhadap sepsis.

Pemberian preventif ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) diberikan pada hewan coba kelompok P1, P2, dan P3. Dosis pemberian preventif pada kelompok P1 sebesar 250 mg/gram BB, kelompok P2 sebesar 500 mg/gram BB dan kelompok P3 sebesar 1000 mg/gram BB. Pemberian ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) diberikan secara per oral dengan menggunakan sonde lambung selama 8 hari berturut-turut pada hari ke-8 hingga hari ke-15. Pemberian ekstrak daun sambiloto dilakukan sebanyak satu kali dalam sehari.

4.4.8 Analisa Aktivitas Enzim SOD (Superoxide Dismutase)

Dilakukan pengambilan sampel darah pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) 6 jam setelah injeksi LPS *E-coli*. Pengambilan darah dilakukan melalui vena *coccygeal* menggunakan *disposable syringe* 5 cc. Sampel darah kemudian dimasukkan kedalam tabung *venoject* EDTA dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm sehingga plasma dan korpuskula akan terpisah. Pengukuran aktivitas enzim SOD dapat dilihat pada **Lampiran 6** (Kotan et al, 2011).

4.4.9 Isolasi Organ Duodenum

Seluruh tikus putih (*Rattus norvegicus*) di euthanasia pada hari ke-22 penelitian atau 7 hari setelah pemaparan LPS dengan cara dislokasi *os cervix*. Tikus putih di posisikan rebah ventral dan dilakukan pembedahan pada rongga abdomen dengan tujuan untuk mengambil sampel organ duodenum. Sampel duodenum yang diperoleh, dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% bertujuan untuk menghilangkan darah. Setelah organ diambil kemudian diinsisi secara melintang searah organ lalu diletakkan pada pot organ yang telah diberi formalin 10% (Jusuf, 2009).

4.4.10 Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum

Proses pembuatan preparat histologi menurut (Junquiera, 2007). Organ duodenum yang sudah difiksasi dalam formalin 10% kemudian melalui beberapa tahap seperti pada **Lampiran 7**.

4.4.11 Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE)

Pewarnaan preparat dengan *Hematoxylin Eosin* (HE) untuk mewarnai jaringan. Zat warna *Hematoxylin* untuk memberi warna biru pada inti sel dan *Eosin* untuk memberi warna merah muda pada sitoplasma sel dengan tahapan seperti pada **Lampiran 8**.

4.4.12 Analisis Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini berupa hasil aktivitas enzim SOD dengan uji *OneWay ANOVA (Analysis of Variant)* dan uji lanjutan BNJ (Beda Nyata Jujur) dengan tingkat kepercayaan $\alpha = 5\%$ apabila hasil analisis ragam berpengaruh nyata. ANOVA digunakan untuk

mengetahui perbedaan tiap kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol positif, kontrol negatif, kelompok perlakuan 1 (P1) , perlakuan 2 (P2), dan perlakuan 3 (P3). Uji BNJ digunakan untuk mengetahui hasil yang paling berbeda nyata. Perubahan gambaran mikroskopis duodenum diamati secara kualitatif dengan mengamati sel epitel pada vili duodenum, pengamatan aktivasi sel goblet, dan sel radang (neutrofil) serta dilakukan dokumentasi kemudian dijelaskan secara deskriptif.