





## **Prosedur Penelitian**

### **Pembuatan Simplisia**

Semua daun tanaman pelawan (daun ke 3,4 dan 5) yang di uji coba dibersihkan dari kotoran yang menempel, kemudian dibilas dengan air mengalir hingga bersih lalu ditiriskan, selanjutnya dikeringkan dengan cara diangin-anginkan atau dijemur dibawah sinar matahari dengan ditutup plastik hitam. Setelah kering, sampel dibersihkan kembali dari kotoran yang mungkin masih tertinggal saat pencucian. Setelah bersih dari kotoran, dilakukan penyerbukan dan pengayakan menggunakan ayakan sehingga didapat serbuk daun, kemudian disimpan dalam wadah bersih dan tertutup rapat (Ditjen POM 2000).

### **Pembuatan Ekstrak Etanol**

Pembuatan ekstrak etanol daun dilakukan dengan menambahkan etanol absolute 95% ke dalam 100 g serbuk daun hingga seluruh sampel terendam dan pelarut dilebihkan setinggi kurang lebih 2 cm di atas permukaan serbuk. Toples ditutup dan direndam selama 2 × 24 jam dan dilakukan pengadukan sesekali kemudian ditampung dalam wadah dan diganti pelarutnya setiap hari. Hasil dari maserasi diuapkan dengan alat *rotary evaporator* (40°C dan 50 rpm) hingga didapat ekstrak kering dari daun (Ditjen POM 2000).

### **Penyiapan Hewan**

Tiga puluh ekor tikus betina diadaptasikan terlebih dahulu dalam kandang individu. Tikus ditempatkan dalam kandang berukuran 34 x 25 x 12 cm per ekor yang beralaskan sekam dan bertutupan kawat. Sekam diganti seminggu sekali. Tikus diberi makan secara teratur dengan kebutuhan diet yang terjaga (*feed intake* diasumsikan sama), minum *ad libitum*, dan ditempatkan pada ruangan dengan pencahayaan selama 12 jam (06.00-18.00), suhu ruangan 20-25°C dengan kelembaban relatif 40-50% sebagai kondisi umumnya.

### **Pembuntingan Hewan**

Tikus jantan dan betina dimasukkan ke dalam satu kandang. Proses perkawinan biasanya terjadi malam hari. Untuk mengetahui terjadinya perkawinan

dilakukan pemeriksaan ulas vagina. Terjadinya perkawinan diindikasikan dengan ditemukannya spermatozoa pada sediaan ulas vagina. Hari ditemukannya spermatozoa pada sediaan ulas vagina ditetapkan sebagai hari pertama kebuntingan (Turner & Bagnara 1976).

#### **Pengelompokan Hewan**

Hewan percobaan terdiri dari 30 ekor tikus betina bunting yang dibagi dalam 2 kelompok perlakuan yaitu kelompok control (KK) dan kelompok perlakuan ekstrak etanol daun pelawan (KP). Masing-masing kelompok terdiri dari 15 ekor tikus bunting. Kemudian setiap kelompok perlakuan dibagi lagi menjadi 3 waktu pengambilan sampel yaitu pada hari ke 3 postpartus, hari ke 5 postpartus, dan hari ke 7 postpartus (Roosita *et al.* 2003).

#### **Perlakuan *In Vivo***

Penelitian menggunakan 2 perlakuan dengan 15 ulangan. Perlakuan yang dimaksud adalah:

- c. Kelompok kontrol (KK), yaitu kelompok tikus betina yang tidak diberi perlakuan.
- d. Kelompok perlakuan (KP), yaitu kelompok tikus betina yang diberi ekstrak etanol daun pelawan dengan dosis 100 mg/kg bobot badan.

Perlakuan pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol daun pelawan peroral yang diberikan dengan cara dicekok pada saat sehari setelah tikus betina melahirkan. Pemberian Perlakuan dilaksanakan selama 7 hari.

#### **Pengamatan dan Pengambilan Sampel**

Pada hari pertama postpartus dilakukan penimbangan bobot badan tikus betina. Kemudian pada hari ke 3, 5, dan 7 postpartus dilakukan penimbangan hewan uji, kemudian dilakukan pembedahan untuk mengambil ovariumnya. Selanjutnya dibuat preparat ovarium dengan bahan fiksatif berupa larutan Bouins dan pewarnaan dengan Hematoxylin dan eosin (Humason 1967). Ovarium diiris secara melintang. Pembuatan preparat histopatologi yaitu:

1. Sampel organ difiksasi di dalam formalin 10% selama 10 jam

2. Sampel didehidrasi di dalam alkohol bertingkat mulai dari alkohol 70%, 80%, 90% (selama 9 jam) dan dilanjutkan dengan alkohol absolut I, II, III masing-masing 1 jam
3. Tahap clearing dengan xylol I, II, III masing-masing 1 jam
4. Sampel diinfiltrasi dalam campuran xylol dan parafin dengan perbandingan volume:
  - d. I = 20 ml : 20 ml (30 menit)
  - e. II = 30 ml : 10 ml (30 menit)
  - f. III = 40 ml total parafin (30 menit)
5. Tahap embedding, yaitu penanaman jaringan dalam blok parafin dan dituang parafin cair hingga memadat
6. Selanjutnya tahap sectioning, yaitu pemotongan jaringan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3-4  $\mu\text{m}$
7. Affiksing yaitu penempelan potongan jaringan ke kaca objek yang diberi glyserin-albumin dan dikeringkan di hotplate 40<sup>o</sup>C
8. Staining, yaitu Pewarnaan Hematoksilin-eosin (HE), sampel dimasukkan ke xylol I, II, III, alkohol absolut 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, aquades dan larutan hematoksilin masing-masing selama 2 menit
9. Sampel dicuci di air mengalir hingga jernih selama 10 menit
10. Sampel dimasukkan ke alkohol berseri 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 2 kali celupan, dan direndam dalam larutan eosin selama 5 menit
11. Sampel dimasukkan ke alkohol berseri 70%, 80%, 90%, alkohol absolut, xylol I, II, III masing-masing 2 kali celupan
12. Mounting, yaitu penutupan sampel dengan cover glass yang direkatkan dengan Canada balsam

Selanjutnya preparat ovarium diamati dengan mikroskop cahaya perkembangan sel folikel-folikel di ovarium, khususnya pada folikel primer, folikel sekunder dan folikel de graff.

#### **Analisis Data**

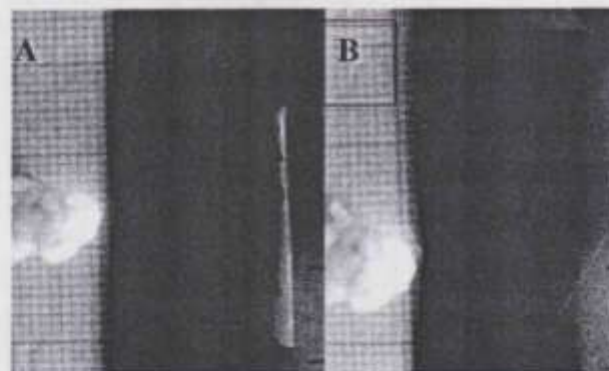
Data penelitian dianalisis secara kualitatif yaitu melihat perkembangan sel-sel folikel folikel di dalam ovarium. Kuantitatif adalah menghitung banyaknya



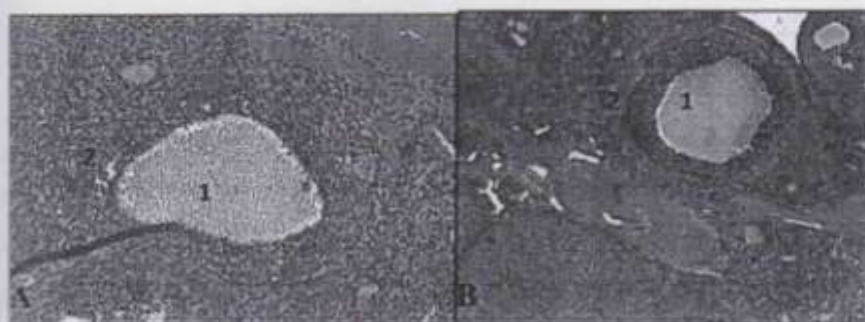
folikel primer, sekunder dan de graff, kemudian data kuantitatif dianalisis menggunakan metode ANOVA untuk menentukan perbedaan yang nyata atau tidak diantara kelompok perlakuan. Apabila terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test (DMRT)* dengan  $\alpha : 0.05$ . Nilai probabilitas ( $p$ )  $< 0.05$  diterima sebagai hal yang berbeda nyata, sedangkan apabila ( $p$ )  $> 0.05$  maka diterima sebagai hal yang tidak berbeda nyata (Mattjik and Sumertajaya 2000).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan makroskopis ovarium tikus pada penelitian ini terdiri dari ovarium kiri dan kanan yang bentuk organnya seperti oval berwarna putih kekuningan. Pada semua mamalia betina terdapat sepasang ovarium dan organ ini terletak di dekat ginjal yaitu tempat pertama kali ovarium mengalami diferensiasi (Nalbandov 1990).



Gambar 2.1 Struktur morfologi ovarium tikus putih betina (A). Ovarium kanan (B). Ovarium kiri.



Gambar 4.2 Sayatan melintang ovarium tikus putih (A). Folikel primer (B) Folikel sekunder. Ket: 1: Oosit, 2: Sel granulosa

Dari hasil penelitian berupa jumlah folikel primer, folikel sekunder dan folikel de graff. Perubahan histopatologi yang diamati adalah terjadinya peningkatan jumlah folikel primer dan folikel sekunder jika dibandingkan dengan kontrol. Data tersebut disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Pengamatan dan Perhitungan Jumlah Jaringan Ovarium Sebelah Kanan dan Kiri.

Jaringan ovarium	perlakuan	Waktu Perlakuan (Hari)							
		Hari ke 0		Hari ke 3		Hari ke 5		Hari ke 7	
		kanan	kiri	Kanan	kiri	kanan	kiri	Kanan	kiri
Folikel primer	Kontrol	2	1	2	3	2	2	3	3
	Ekstrak etanol	2	3	7	8	9	10	10	9
Folikel sekunder	kontrol	2	1	2	2	2	4	5	4
	Ekstrak etanol	1	2	10	12	10	11	9	8
Folikel De graff	Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ekstrak etanol	-	-	-	-	-	-	-	-

Hasil perhitungan jumlah sel folikel pada ovarium yaitu sel folikel primer pada ke 5 dan 7 menghasilkan jumlah paling banyak ada 9 dan 10 sel folikel, sedang kontrol hanya berjumlah 2 dan 3 sel folikel. Pada pengamatan ini tidak ditemukan sel folikel de graff. Berdasarkan hasil penelitian terhadap perkembangan folikel primer baik pada ovarium sebelah kanan maupun kiri, diperoleh data yang menunjukkan bahwa terdapat pengaruh dari pemberian ekstrak daun pelawan terhadap perkembangan folikel primer.



Gambar 2.2 Sayatan Melintang Ovarium Tikus Putih dengan perbesaran 100 x. A. kontrol (0 mg/kg BB), B. P1 (Ekstrak Etanol Daun Pelawan 20 mg/kg BB). Ket. 1. Oosit, 2. Sel granulosa, 3. Sel granulosa pada sel folikel sekunder.

Dari hasil penelitian di atas yang menunjukkan adanya peningkatan jumlah perkembangan folikel ovarium pada hari ke 5 dan 7. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya bahan aktif pelawan yaitu salah satunya steroid. Bahan aktif steroid tersebut diduga sebagai bahan aktif yang bekerja sebagai faktor yang memicu perkembangan sel folikel. Bahan aktif tersebut diduga mampu mengakibatkan gangguan pada jalur hipotalamus hipofase yang selanjutnya berpengaruh terhadap pembentukan, pematangan dan perkembangan folikel (Limbong 2007).

Folikel de graff pada penelitian ini belum terbentuk, dimana diketahui folikel de graff merupakan folikel matang dengan memiliki area antrum yang besar yang dipenuhi dengan cairan dibungkus dengan granulosa (Leeson 1996). Hormon FSH dan LH yang dapat mempengaruhi perkembangan folikel ovarium, juga terdapat beberapa hormon protein lain yang berasal dari ovarium, salah satunya inhibidin.

Menurut (Winda 2006) sumber utama inhibidin di ovarium adalah sel granulosa. Inhibidin mensupresi pituitari terhadap produksi FSH. Inhibidin dibagi menjadi inhibidin A dan B, Inhibidin B disekresikan terutama dalam fase folikular dengan kadarnya menurun pada pertengahan fase folikular dan menjadi tidak terdeteksi setelah lonjakan LH. Konsentrasi inhibidin A rendah selama pertengahan pertama fase folikular tapi meningkat selama pertengahan fase folikular dan puncaknya pada fase luteal. Inhibidin yang terdapat pada ovarium



juga dapat menyebabkan terhambatnya produksi gonadotropin yang menyebabkan terganggunya perkembangan folikel. Dari keterangan tersebut diketahui bahwa sel-sel *granulosa* merupakan sumber utama yang menghasilkan *inhibidin* pada ovarium. Pematangan folikel sangat dipengaruhi oleh hormon-hormon gonadotropin LH dan FSH. Atas rangsangan FSH dari adenohypofysa sejumlah folikel vesikuler mulai berkembang. Sementara folokel-folikel berkembang, sejumlah estrogen yang semakin banyak dihasilkan oleh teka interna akan diabsorpsi kedalam sirkulasi tubuh dan juga kedalam cairan folikuler (Toilehere 1981). Pada hewan betina FSH merangsang pertumbuhan folikel, begitu juga dengan LH yang diketahui dapat membantu perkembangan folikel hingga folikel itu mencapai proses pematangan yang sempurna. LH juga merangsang produksi estrogen dalam folikel oleh sel-sel *granulosa* dan teka interna (Partodihardjo 1992).

#### KESIMPULAN

Dengan pemberian ekstrak etanol daun Pelawan ternyata dapat memicu perkembangan folikel pada ovarium. Hal ini kemungkinan senyawa setoid yang dikandung ekstrak etanol daun Pelawan yang mempengaruhi produksi FSH dan LH yang akan memicu perkembangan sel-sel folikel di ovarium.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bobak, 2004. *Keperawatan Maternitas*. Ed 4. Alih bahasa Lawdermik, dkk Jakarta : EGC.
- Ditjen POM. 2000. *Parameter Standart Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Junqueira, LC. 2007. *Persiapan jaringan untuk pemeriksaan mikroskopik. Histology Dasar: teks dan atlas*. Ed10. Jakarta : EGC.
- Kimball, John W. 1991. *Biologi Edisi ke 5*. Jilid 2. Jakarta: Erlangga.
- Leeson, Roland. 1996. *Buku Ajar Histologi Edisi V*. Penerjemah : S Koesparto Siswojo dkk. Jakarta : EGC
- Limbong, Theresia. 2007. Pengaruh Ekstrak Ethanol Kulit Batang Pakettu (*Ficus superba* Miq) Terhadap Folikulogenesis Ovarium Mencit (*Mus*



*musculus*). Dalam *Abstrak Jurnal Penelitian*. Surabaya : Universitas Airlangga

Manjang. 2001. *Survey dan profil fitokimia tumbuhan Sumbar, kajian terpenoid dan steroid*. makalah Workshop peningkatan SDM untuk pemanfaatan SDA hayati dan rekayasa bioteknologi, FMIPA Unand-Dikti Depdiknas, Padang, 8-9.

Matjik, A dan Sumetajaya, M. 2000. *Perencanaan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab*. Bogor: IPB Press.

Mochtar, Rustam. 1998. *Sinopsis Obstetri: Obstetri Fisiologi, Obstetri Patologi*. Jakarta: EGC.

Nalbandov R. 1990. *Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas. Fisiologi Komparatif pada Hewan Domestifikasi dan Laboratorium serta Manusia (diterjemahkan oleh Sunaryo)*. Jakarta: UI Press.

Partodihardjo, Soebadi. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Jakarta : Mutiara Sumber Widya

Roosita K *et al.* 2003. Efek Jamu Bersalin *Galohgor* Terhadap Involusi Uterus dan Gambaran Darah Tikus (*Rattus sp.*). *Media Gizi dan Keluarga* 27: 52-57.

Sartika , Dewi. 2013. Uji In Vitro Tanaman Potensial Antiurolithiasis. Skripsi. UR. Pekanbaru.

Satyaningtjas *et al.* 2014. Kinerja Reproduksi Tikus Bunting Akibat Pemberian Ekstrak Etanol Purwoceng. *Jurnal Kedokteran Hewan* 8:35-37.

Toelihere, M.R. 1979. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Angkasa. Bandung.

Turner CD dan Bagnara JJ. 1976. *Endokrinologi Umum*. Harjoso, penerjemah. Surabaya: Airlangga University Press.

Utama, EP. 2002. Senyawa Antibakteri dari Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang pelawan (*Tristania whitiana* Griff.). Skripsi. IPB. Bogor.

Winda, 2006. Siklus Hidup Ovarium. *Obstetri dan Ginekologi*. Padang: Universitas Negeri Padang

