

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian tentang pengaruh ekstrak air daun katuk (*Sauropus androgynus*) terhadap berat uterus dan tebal endometrium pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) menopause ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 5 perlakuan 6 ulangan. Kelompok kontrol (+) yakni tikus betina ovariectomi tanpa perlakuan pemberian ekstrak, kelompok kontrol (-) tikus betina normal, sedangkan kelompok perlakuan yakni kelompok perlakuan tikus betina ovariectomi dengan pemberian ekstrak air daun katuk (*Sauropus androgynus*) dengan 3 dosis yang berbeda yaitu 15 mg/kgBB, 30 mg/kgBB dan 45 mg/kgBB.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret – Juni 2014 di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Hewan Coba, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

### 3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang dalam penelitian ini adalah variabel bebas, variabel terikat, dan variabel terkendali.

1. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak air daun katuk dengan 3 dosis yaitu 15 mg/kgBB, 30 mg/kgBB dan 45 mg/kgBB.
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah berat uterus dan pengukuran tebal endometrium.
3. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah tikus betina menopause usia 3 bulan, berat sekitar 200-350 gram.

### 3.4 Populasi dan Sampel

Hewan uji yang dipakai adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariectomi jenis kelamin betina, umur 3 bulan dengan berat badan rata-rata 200-300 gram dan tikus putih (*Rattus norvegicus*) normal. Tikus ovariectomi yang diperoleh dari Laboratorium Universitas Brawijaya Malang. Simplisia daun katuk diperoleh dari Materia Medica Batu Malang. Ekstrak daun katuk diperoleh dari Universitas Muhammadiyah Malang.

### 3.5 Pembagian Kelompok Sampel

Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dan 6 ulangan, adapun pembagian kelompok perlakuan sebagai berikut :

1. Kelompok I (kontrol positif) yakni tikus betina ovariectomi tanpa perlakuan pemberian ekstrak.
2. Kelompok II (kontrol negatif) yakni tikus betina normal yang tidak diovariectomi dan tanpa perlakuan pemberian ekstrak.
3. Kelompok III yakni kelompok tikus betina ovariectomi dengan pemberian ekstrak air daun katuk (*Sauropus androgynus*) dengan 3 dosis yang berbeda yaitu 15 mg/kgBB, 30 mg/kgBB dan 45 mg/kgBB.

### 3.6 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.6.1 Alat-alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kandang, bak plastik, tempat minum, timbangan analitik, seperangkat alat bedah, seperangkat alat gelas ( gelas ukur 100 ml, beaker glass 50 ml, pipet tetes), spuit oral 3ml, hand glove, masker, mikroskop, kaca benda, dan kaca penutup.

#### 3.6.2 Bahan-bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tikus menopause ovariectomi sebanyak 24 ekor, dan tikus putih betina normal sebanyak 5 ekor, sekam padi, ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus*), air, alkohol 70 %, tissue, klorofom, pewarna hematoxylin, dan pewarna eosin.

### **3.7 Prosedur Penelitian**

Prosedur penelitian yang dilakukan sebagai berikut :

#### **3.7.1 Preparasi**

##### **3.7.1.1 Persiapan Hewan Coba**

1. Hewan coba diaklimatisasi di dalam laboratorium selama 1 minggu sebelum perlakuan.
2. Selama proses aklimatisasi tikus ovariektomi diberi makan pelet (BR 1) dan air minum PAM.
3. Setelah aklimatisasi, ditimbang berat badan tikus menopause
4. Pengelompokan dilakukan sesuai kode kandang kelompok perlakuan dengan distribusi tikus ovariektomi dengan berat badan secara acak.
5. Tikus ovariektomi yang siap digunakan untuk proses penelitian adalah dengan kisaran berat badan 200-350 gram.

##### **3.7.1.2 Pembuatan Simplisia daun katuk**

Pembuatan Simplisia daun katuk dilakukan di Balai Materia Medika Malang meliputi:

1. Persiapan bahan yaitu bahan daun katuk segar dicuci, dibersihkan, kemudian ditiriskan.
2. Pengeringan: cara pengeringan yang digunakan terdiri dari 3 cara yaitu: 1) Pengeringan dengan matahari sinar, 2) Pengeringan dengan alat pengering (oven), 3) Pengeringan dengan aliran udara (kering angin).

Pelaksanaan pengeringan :

Bahan yang sudah dibersihkan ditimbang 1 kg, kemudian ditaruh di alas (rak kaleng). Selanjutnya, untuk pengeringan dengan sinar matahari dijemur di atas rak bambu di tempat terbuka. Untuk pengeringan angin diletakkan dalam ruangan dengan aliran udara normal, sedangkan untuk pengeringan oven dipanaskan pada suhu 40° C. Pengeringan dianggap selesai apabila bahan sudah dapat dipecah atau patah apabila diremas dengan tangan. Lama pengeringan pada pengeringan matahari berlangsung selama 3x7 jam (hari ke 1,2,3) dengan cuaca normal atau matahari penuh. Pengeringan dengan oven dilakukan pada suhu 40° C selama 8 jam. Pengeringan dengan angin atau udara mengalir berlangsung selama 5 hari 5 malam non stop. Bahan yang sudah kering ditimbang, kemudian dikemas dalam kantong plastik yang kedap udara.

Proses pengeringan ekstrak daun katuk dengan hasil terbaik menurut Eka (2012) adalah dengan metode sublimasi menggunakan *freeze dryer* yakni dengan membekukan terlebih dahulu bahan yang akan dikeringkan, kemudian dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan tekanan rendah sehingga kandungan air yang sudah menjadi es akan langsung menjadi uap. Kelebihan metode ini adalah karena menggunakan suhu yang relatif rendah maka cocok untuk hasil ekstraksi simplisia yang tidak stabil dengan suhu ruang, serta tidak akan mengubah tekstur dan kandungan yang ada dalam simplisia daun katuk.

### 3.7.1.3 Pembuatan Ekstrak Air Daun Katuk

Langkah yang dilakukan dalam pembuatan ekstrak air daun katuk sesuai dengan penelitian Prishandono (2009) yakni :

1. Penambahan air dengan perbandingan simplisia dan air 1:2 (b/v).
2. Perebusan dalam waterbath pada suhu 70<sup>0</sup> C selama 2 jam, kemudian disaring dengan kain saring dan kertas Whatman sehingga dihasilkan filtrat dan residu (Ia).
3. Residu Ia diekstraksi kembali dengan akuades dengan maserasi di atas shaker dengan kecepatan putar 2500 rpm selama 6 jam. Setelah itu disaring dengan kain saring dan kertas Whatman sehingga dihasilkan filtrat dan residu (Ib).
4. Filtrat Ia dan Ib digabung sehingga diperoleh ekstrak daun katuk yang dilarutkan dengan pelarut air atau aquades.

### 3.7.1.4 Perhitungan Dosis dan Pengenceran Ekstrak Air Daun Katuk

Berdasarkan penelitian Hikmah (2014) tentang ekstrak daun katuk sebagai terapi dari premenopause akibat rendahnya estrogen, digunakan dosis sebesar 15 mg/kgBB, 30 mg/kgBB, dan 45 mg/kgBB. Hasil terbaik didapat pada dosis 30 mg/kgBB.

Pada penelitian ini menggunakan 3 dosis yang berbeda yaitu :

Dosis I : 15 mg/kgBB

Dosis II : 30 mg/kgBB

Dosis III : 45 mg/kgBB

Dibuat stok kebutuhan katuk sebanyak 250 ml dengan dosis tertinggi, kemudian dilakukan pengenceran untuk stok pada dosis yang lebih rendah dengan rumus pengenceran :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan :

$M_1$  = Konsentrasi dosis yang dibuat

$V_1$  = Volume dosis yang dibuat

$M_2$  = Konsentrasi dosis stok

$V_2$  = Volume dosis stok

#### 3.7.1.5 Perlakuan Ekstrak Air Daun Katuk

Pemberian perlakuan aquades ekstrak daun katuk adalah dengan injeksi dengan spuit secara gavage / oral 2,5 ml sesuai dengan kelompok perlakuan selama 1 bulan. Metode pemberian oral yakni dilakukan dengan memakai jarum yang panjangnya sekitar 10 cm dengan ujungnya yang tajam telah dimodifikasi yaitu ditambah dengan bentukan bundar untuk kemudian dimasukkan ke dalam mulut.

#### 3.7.1.6 Pembuatan Tikus Betina Ovariectomi

Ovariectomi adalah pengambilan ovarium melalui pembedahan. Dalam penelitian ini dilakukan ovariectomi pada tikus betina. Pembuatan tikus betina ovariectomi menurut *Cancer chemoprevention research center* fakultas farmasi UGM adalah sebagai berikut :

1. Penimbangan dilakukan pada tikus, kemudian disiapkan di atas meja untuk dianestasi.
2. Larutan disiapkan larutan anestesi pada tikus dengan campuran :

- a. Acepromazine : 0,5-2,5 mg/kg BB
  - b. Ketamin : 50-150 mg/kg BB, di dalam spuit disposable insulin  
perkiraan volume larutan 0,2 ml.
3. Anestesi dilakukan di daerah paha bagian dalam atau luar secara *intra muscular*. Sekitar 5 menit, tikus akan tertidur ( $\pm 45$  menit).
  4. Tikus diletakkan di atas papan kayu yang sebelumnya telah terlapisi plastik lalu keempat kaki ditancapkan dengan jarum (posisi tikus telungkup).
  5. Selanjutnya rambut dicukur tikus di area bedah  $\pm$  seluas 4 cm<sup>2</sup>.
  6. Insisi pada area bedah (agak menjorok ke dalam tubuh jika dipegang atau 2 cm mengikuti tulang belakang dengan jarak 1,5 cm dari tulang belakang).
  7. Ovarium dicari (berbentuk granul-granul seperti anggur dan berada di bawah kolon) kemudian potong dan disisihkan.
  8. Betadine dioleskan betadine pada luka tikus yang terbuka.
  9. Kulit dijahit kulit dalam sebanyak 1 simpul dan kulit luar sebanyak 2 simpul.
  10. Tikus ditempatkan tikus yang telah dioperasi pada kandang tunggal yang beralaskan kertas dan tisu lalu diberi makanan dan botol minum.

### 3.7.1.7 Pengambilan Sampel

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

1. Hewan coba dianastesi secara inhalasi dengan menggunakan kloroform.
2. Pembedahan dilakukan secara vertikal dari daerah abdomen posterior menuju anterior dengan membuka daerah rongga perut dan rongga dada.
3. Pengambilan uterus dilakukan, uterus diletakkan di atas kertas saring untuk dibersihkan dari darah dan cairan tubuh tikus. Selanjutnya, uterus ditimbang untuk mendapatkan data berat basah uterus.

### 3.7.1.8 Penentuan Tebal Endometrium Uterus

Berdasarkan penelitian Hikmah (2014) tentang ekstrak daun katuk sebagai terapi dari premenopause akibat rendahnya estrogen. Sampel uterus diambil setelah dilakukan penimbangan berat basah uterus. Uterus dibuat sediaan histologis dengan pewarnaan HE dengan ketebalan 10 $\mu$ m. Penentuan tebal endometrium dilakukan dengan mengukur bagian tengah uterus, dikarenakan bagian tengah uterus ini sudah mewakili penentuan tebal endometrium pada setiap sayatan uterus sampel.

### 3.7.1.9 Pembuatan Preparat Histologi

Pembuatan preparat histologi uterus dilakukan dengan langkah sebagai berikut :

#### 1. Tahap Fiksasi

Pada tahap ini, uterus difiksasi pada larutan formalin 10% selama 12-18 jam diulang sebanyak 2 kali pada larutan yang berbeda.

#### 2. Tahap Dehidrasi

Pada tahap ini, uterus yang telah difiksasi kemudian didehidrasi pada larutan etanol 70% selama 1 jam, kemudian dipindahkan dalam larutan etanol 80%, dilanjutkan kedalam larutan etanol 95% sebanyak 2 kali dan dalam etanol absolut selama 1 jam dan diulang sebanyak 2 kali pada etanol absolut yang berbeda.

#### 3. Tahap Clearing (Penjernihan)

Pada tahap ini, uterus yang telah didehidrasi kemudian diclearing untuk menarik kadar etanol dengan menggunakan larutan xylol I selama 1 jam dan dilanjutkan ke larutan xylol II selama 1 jam.

#### 4. Tahap Embedding

Pada tahap ini, uterus dimasukkan kedalam kaset dan diinfiltrasi dengan menuangkan paraffin yang dicairkan pada suhu

56-58 C, kemudian parafin dibiarkan mengeras dan dimasukkan ke dalam freezer selama 2 jam.

#### 5. Tahap Sectioning (Pemotongan)

Pada tahap ini, uterus 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<sup>0</sup>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 xylol I selama 2 menit.
- b) Preparat diambil dari xylol I dan direndam dalam larutan xylol II selama 2 menit.
- c) Preparat diambil dari xylol II dan direndam dalam ethanol absolut selama 1 menit.
- d) Preparat diambil dari ethanol absolut dan direndam dalam ethanol 95% selama 1 menit.
- e) Preparat diambil dari ethanol 95% dan direndam ethanol 50% selama 30 detik.
- f) Preparat diambil dari ethanol 95% dan direndam dalam running tap water selama 5 menit.

- g) Preparat diambil dari running tap water dan direndam dalam mayer's haematoksin (Haematoksin kristal 1 g, aquadestilata 1000 ml, sodium iodate 0,20 g, amonium 50 g, asam sitrat 1 g, chloral hidrat 50 g) selama 15 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 1 % selama 2 menit.
- j) Preparat diambil dari larutan eosin kemudian dimasukkan dalam ethanol 95% selama 2 menit, kemudian dimasukkan ke dalam ethanol absolut selama 2 menit diulang 3 kali pada ethanol absolut yang berbeda.
- k) Preparat diambil dan direndam dalam xylol III selama 2 menit, kemudian dipindahkan dalam xylol IV selama 2 menit dan terakhir dipindahkan ke dalam xylol V selama 2 menit.
7. Tahap Mounting dengan entelan dan deckglass
- Slide dibiarkan kering pada suhu ruangan.
  - Setelah slide kering siap untuk diamati.

Pengamatan Preparat endometrium: Preparat dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron dengan kamera dot slide Olympus XC10 diukur dengan menggunakan Image G dengan penampang keseluruhan 5 diameter lapang

pandang yang diperjelas dengan perbesaran 40x untuk melihat ketebalan dari endometrium uterus.

### 3.8 Analisis data

Untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus*) terhadap berat uterus dan tebal endometrium pada tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) menopause dianalisis dengan One Way ANOVA. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan, maka diuji lanjut BNT 5%. Selain itu juga dilakukan uji regresi linear dan uji korelasi pearson.

