

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian tentang pengaruh ekstrak air daun katu (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) terhadap berat uterus dan tebal endometrium mencit (*Mus musculus*) premenopause ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan. Kelompok kontrol (-) yakni mencit betina normal dengan induksi prostaglandin, kelompok kontrol (+) mencit dengan induksi VCD dengan pemberian aquadest, sedangkan kelompok perlakuan yakni kelompok dengan perlakuan pemberian ekstrak air daun katu (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) dengan 2 dosis yang berbeda.

3.2. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2013 – Agustus 2014 bertempat di Laboratorium Hewan Coba, Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Optik Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembuatan ekstrak air daun katu (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang

3.3. Variabel Penelitian

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

1. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak air daun katuk per oral dengan 2 konsentrasi yang berbeda yaitu 15 mg/kgBB dan 30 mg/kgBB
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah berat basah uterus, tebal tiap endometrium dalam gambaran histologi uterus mencit serta berat badan mencit.
3. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah mencit betina strain balb/c usia 2 bulan 1 minggu, berat sekitar 21 – 25 gr

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat – alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kandang bak plastik, tempat minum, seperangkat alat bedah, timbangan analitik, seperangkat alat gelas (gelas ukur 25 ml, beaker glass 25 ml, beaker glass 50 ml, pipet volume 5 ml), bola hisap, mikropipet 100-1000 μ l, *blue tip*, alat suntik disposable 1 ml 27 G, spuit oral 1 ml 23 G, *hand glove*, masker, *rotary evaporator*, *freeze dryer*, mikroskop, mikroskop komputer, mikrotom, kaca benda dan kaca penutup.

3.4.2. Bahan – bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mencit, daun katu, air, alkohol 70% (*One Med*), VCD (4-Vinyl cyclohexane-dioxide) (*Ted Pella, Inc.*) yang disimpan dalam suhu -20°C , kloroform, kapas, tissue, NaCl 0,9%, minyak wijen (*Lee Kum Keen, Xinhui*), parafin, pakan kode SP, skam, prostaglandin (*Prolyse, Meyer Laboratories*), pewarna GIEMSA, buffer GIEMSA, pewarna Hematoxylin, pewarna Eosin dan xylol.

3.5. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan sebagai berikut :

3.5.1. Preparasi

3.5.1.1. Persiapan Hewan Coba

Sebanyak 42 ekor mencit diaklimasi di dalam laboratorium selama 1 minggu sebelum perlakuan. Selama proses aklimasi mencit diberi makan pelet SP dan air minum PAM secara *ad libitum*. Setelah aklimasi, ditimbang berat badan mencit dan dilakukan pengelompokan sesuai kode kandang kelompok perlakuan dengan distribusi mencit dengan berat badan secara acak. Dari 42 ekor mencit, diambil 30 ekor mencit yang siap digunakan untuk proses penelitian yakni dengan kisaran berat badan 21 – 25 gram.

3.5.1.2. Perhitungan Dosis dan Pembuatan Larutan VCD

Perhitungan dosis VCD sesuai dengan penelitian Kempen (2011) yang menyatakan bahwa pemberian dosis rendah 160 mg/KgBB selama 10 hari

dalam 14 hari (5 kali seminggu dalam 14 hari) telah menyebabkan terjadinya kerusakan berupa apoptosis pada folikel primer dan primordial. Berdasarkan dosis 160 mg/kgBB dengan berat badan berkisar 20 gr maka kebutuhan per ekornya adalah 3,2 mg/ekor. Menurut Kusumawati (2004), volume maksimum injeksi intraperitoneal pada mencit adalah sebanyak 1 ml, pada penelitian ini digunakan 0,5 ml per injeksi. Konsentrasi VCD perlakuan adalah 6,4 mg/ml.

Pada injeksi digunakan 30 ekor mencit dengan kebutuhan total VCD perlakuan adalah 0,5 ml x 30 ekor x 14 hari = 210 ml dengan konsentrasi 160 mg/kgBB. Pembuatan larutan VCD perlakuan dengan menghitung :

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$\text{Volume} \times \text{Konsentrasi VCD Stock} = \text{Volume} \times \text{Konsentrasi Larutan VCD Perlakuan}$$

$$\text{Volume Campuran} = \frac{\text{Kebutuhan Larutan VCD} \times \text{Konsentrasi VCD per ekor}}{\text{Konsentrasi VCD}}$$

$$\text{Volume Campuran} = \frac{210 \text{ ml} \times 6,4 \text{ mg/ml}}{1000 \text{ mg/ml}}$$

$$\text{Stock} = 1,344 \text{ ml}$$

Maka dibuat larutan stock sebanyak 210 ml dengan melarutkan 1,344 ml VCD dan 208,656 ml pelarut minyak wijen. Stock larutan VCD disimpan refrigerator dengan suhu 5⁰ C.

3.5.1.3. Perhitungan Dosis dan Pengenceran Prostaglandin

Dosis prostaglandin yang diberikan pada mencit adalah sesuai dengan yang tertera pada botol yakni 11 mg/2 ml atau 5,5 mg/ml secara intramuskular, dengan pemberian sebanyak 0,5 ml pada anjing. Kemudian dihitung dosis

untuk mencit menggunakan tabel Luas Permukaan untuk Konversi Dosis (Kusumawati, 2004). Dosis absolute pada anjing : $(0,5 \times 12) \text{ ml} = 6 \text{ ml}$, faktor konversi anjing ke mencit yakni 0,008 maka $(6 \times 0,008) \text{ ml} = 0,048 \text{ ml}$. Sedangkan injeksi intramuskular pada mencit per ekor maksimal sebanyak 0,05 ml, maka dilarutkan prostaglandin dari stok sebanyak 0,048 ml dalam aquades hingga 0,05 ml.

3.5.1.4. Pembuatan Ekstrak Air Daun Katu

Langkah yang dilakukan dalam pembuatan ekstrak air daun katu 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°C selama 2 jam, kemudian disaring dengan kain saring dan kertas Whatman no 42 sehingga dihasilkan filtrat dan residu (1a)
3. Residu 1a diekstraksi kembali dengan akuades dengan maserasi di atas shaker dengan kecepatan putar 250 rpm selama 6 jam. Setelah itu disaring dengan kain saring dan kertas Whatman no 42 sehingga dihasilkan filtrat dan residu (1b)
4. Filtrat 1a dan filtrat 1b digabung sehingga diperoleh ekstrak daun katu yang dilarutkan dengan pelarut air. Apabila ekstrak yang dihasilkan memiliki konsentrasi yang rendah maka dilakukan pemekatan dengan menggunakan rotary evaporator

Proses pengeringan ekstrak air daun katu 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 katu.

3.5.1.5. Perhitungan Dosis dan Pengenceran Ekstrak Air Daun Katu

Berdasarkan penelitian Wiyasa (2009) tentang ekstrak tokbi (*Pueraria lobata*) yang mengandung isoflavon sebagai terapi dari osteoporosis akibat rendahnya estrogen di menopause, 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 : 0 mg/kgBB atau 0 mg/ekor/hari

Dosis II : 15 mg/kgBB atau 0,3375 mg/ekor/hari

Dosis III : 30 mg/kgBB atau 0,675 mg/ekor/hari

Dibuat stock kebutuhan katu sebanyak 40 ml dengan dosis tertinggi, kemudian dilakukan pengenceran untuk stock 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 M_2 = Konsentrasi dosis stock

V_1 = Volume dosis yang dibuat V_2 = Volume dosis stock

3.5.1.6. Pembagian Kelompok Sampel

Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dan 4 ulangan, adapun pembagian kelompok perlakuan sebagai berikut :

1. Kelompok I (Kontrol negatif, induksi Prostaglandin, tanpa perlakuan)
2. Kelompok II (Kontrol positif, pemberian VCD, tanpa terapi)
3. Kelompok III (VCD + Ekstrak air daun katu 15 mg/kgBB)
4. Kelompok IV (VCD + Ekstrak air daun katu 30 mg/kgBB)

3.5.2. Pemberian Perlakuan

3.5.2.1. Pemberian VCD

Pemberian perlakuan VCD adalah injeksi VCD pada hewan coba dengan spuit secara intraperitoneal sesuai dengan kelompok perlakuan sebanyak 160 mg/kgBB selama 10 hari dalam 14 hari perlakuan. Metode injeksi intraperitoneal sesuai dengan Kusumawati (2004) yakni di quadrant kiri bawah abdomen untuk menghindari organ – organ vital. Jarum dimasukkan sejajar dengan kakinya kemudian didorong melalui dinding abdomen ke dalam rongga peritoneal. Seorang asisten diperlukan untuk membantu mengendalikan hewan karena pergerakan mendadak dapat membahayakan hewan, misal jarum mengenai organ vital di rongga abdomen.

3.5.2.2. Pemberian Prostaglandin

Pemberian prostaglandin untuk mencit kelompok Kontrol (-) Negatif adalah dengan injeksi mencit dengan spuit secara intramuskular sesuai dengan

dosis yang telah ditentukan. Metode pemberian intramuskular pada mencit sesuai dengan Kusumawati (2004) yaitu suntikan intramuskular dilakukan di daerah kaki belakang dan muskulus yang dipilih sebaiknya muskulus *quadriцеп* dan *tricep*. Rasa sakit setelah penyuntikan dapat diatasi dengan teknik penyuntikan perlahan atau volume yang tidak terlalu banyak. Hal yang harus dihindari adalah adanya kemungkinan jarum mengenai pembuluh darah atau bahkan kemungkinan materi masuk ke pembuluh darah.

3.5.2.3. Pengecekan Siklus Estrus

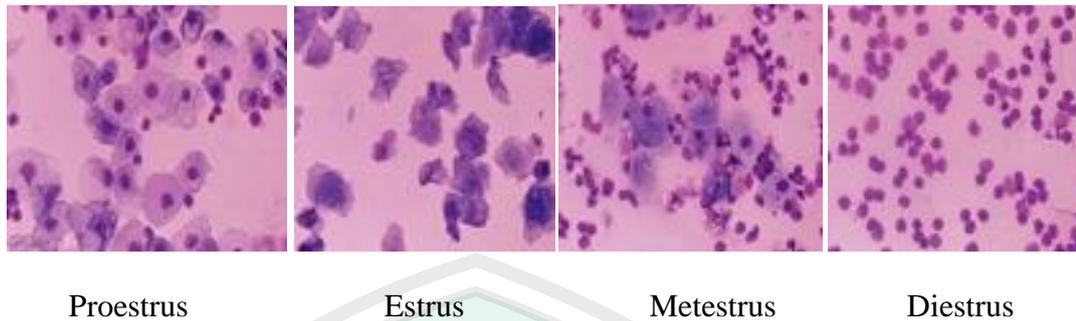
Pengecekan siklus estrus dilakukan dengan metode apusan vagina sesuai dengan Kristanti (2010) yakni :

1. Kaca objek diberi tanda sesuai dengan identitas mencit yang akan diperiksa
2. Ekor mencit betina dipegang dengan tangan kiri dan diangkat terlebih dahulu
3. Larutan NaCl diambil sedikit dengan pipet yang ujungnya telah ditumpulkan terlebih dahulu.
4. Larutan NaCl dimasukkan dengan pipet kedalam vagina, kemudian langsung dihisab kembali dengan pipet yang sama
5. Larutan hasil apusan ditunggu \pm 15 menit hingga kering, kemudian diwarnai dengan pewarnaan Giemsa dan ditunggu \pm 15 menit hingga sekiranya sel telah terwarnai

Hasil dari apusan vagina diamati di bawah mikroskop kemudian diinterpretasikan fase estrus menurut Akbar (2010) yakni :

Tabel 3.1. Perubahan pada Epitel Vagina selama Siklus Estrus

Fase Siklus Estrus	Lama Fase (jam)	Gambaran Ulas Vagina dari Berbagai Sumber			
		Dalal <i>et al</i> (2001)	Smith & Mangkoewidjojo (1988)	Nalbandov (1999)	Syahrum, <i>et al</i> (1994)
Proestrus	12	Sel epitel, leukosit sangat sedikit	Sel epitel berinti	Sel epitel berinti	Sel epitel berinti, leukosit sedikit
Estrus	12	Sel tanduk makin banyak	Sel epitel mengalami penandukan	Sel berkornifi kasi	Sel epitel bertanduk banyak
Metestrus	12	Sel tanduk, leukosit lebih banyak	Sel epitel berkornifikasi, terdapat leukosit	Sel berkornifi kasi diantara leukosit	Sel epitel bertanduk, leukosit lebih banyak
Diestrus	65	Leukosit dan sel epitel berinti	Leukosit dan sel epitel	Sel epitel berinti dan leukosit	Sel epitel berinti dan leukosit



Gambar 3.1 Pengamatan Siklus Estrus Mencit dengan Apusan Vagina (Rasad, 2012).

Hasil pengamatan dilakukan perbandingan antara mencit normal dan mencit perlakuan VCD. Menurut Wiyasa (2008), kondisi premenopause pada rodentia dapat diketahui salah satunya dengan apusan vagina yang hasilnya didominasi oleh sel epitel parabasal (leukosit) dan intermedier (epitel berinti) yakni kondisi diestrus. Berdasarkan hasil apusan vagina, apabila mencit dalam keadaan premenopause maka dilakukan pemberian perlakuan ekstrak air daun katu sesuai kelompok perlakuan.

3.5.2.4. Perlakuan Ekstrak Air Daun Katu

Pemberian perlakuan etanol ekstrak daun katu adalah dengan injeksi mencit dengan spuit secara gavage / oral sesuai dengan kelompok perlakuan selama 30 hari. Metode pemberian oral sesuai dengan Kusumawati (2004) 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.

3.5.3. Pengambilan Data

3.5.3.1. Dislokasi Hewan Coba dan Pengambilan Uterus

Sebelum dilakukan dislokasi dan pengambilan uterus, dilakukan pengecekan siklus estrus seperti langkah pada 3.5.2.3. Pengecekan siklus estrus bertujuan untuk memastikan keseragaman fase agar dapat dilakukan perbandingan data berat uterus dan tebal endometrium. Adapun fase siklus estrus yang digunakan dalam penelitian ini adalah fase diestrus sebab merupakan fase yang mudah ditemui pada seluruh kelompok perlakuan terutama pada kelompok K+ yakni akibat pemberian VCD maka siklus estrus memanjang pada fase diestrus (perkembangan folikel preantral).

Langkah yang dilakukan dalam dislokasi hewan coba dan pengambilan uterus adalah dengan dipersiapkan alat dislokasi, kemudian dibius mencit dengan dimasukkan dalam toples yang berisi kapas berkloroform. Selanjutnya dikeluarkan mencit dan diletakkan pada papan seksi dan dikeluarkan uterus dari tubuh mencit.

3.5.3.2. Penimbangan Berat Uterus

Penimbangan berat uterus dilakukan dengan dicuci terlebih dahulu menggunakan NaCl 0,9% kemudian diletakkan pada kertas saring dan selanjutnya ditimbang berat basah uterus menggunakan timbangan analitik.

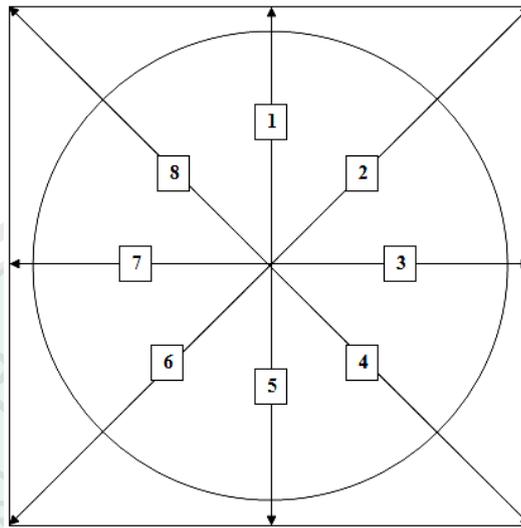
3.5.3.3. Pembuatan Preparat dan Pengamatan Histologi Uterus

Pembuatan sediaan histologis uterus pewarnaan HE dengan ketebalan 6 μ dilakukan sesuai dengan metode oleh (Puspitadewi, 2007) yakni sebagai berikut :

1. *Isolasi* pengambilan uterus
2. *Washing*, pencucian dengan garam fisiologis (NaCl 0,09%)
3. *Fiksasi* dengan Bouin selama 24 jam
4. *Washing*, pencucian dengan alkohol 70%
5. *Dehidrasi*, pengeluaran air dengan alkohol bertingkat (80-100%) masing-masing selama 3 jam
6. *Clearing*, penjernihan dengan xylol selama 3 jam
7. *Infiltrasi*, penyusupan paraffin berseri (paraffin I, II dan III) masing-masing selama 45, 60 dan 75 menit
8. *Embedding*, pembedaman dalam paraffin
9. *Section*, pengirisan dengan tebal sayatan 6 μ
10. *Affixing*, perekatan pada kaca obyek dalam gliserin albumin
11. *Deparafinasi*, menghilangkan paraffin
12. *Staining*, pewarnaan
13. *Mounting*, penutupan dengan kaca penutup

Pengambilan data tebal endometrium uterus sesuai dengan metode oleh Muchsin (2009) dengan cara mengukur tebal masing – masing lapisan pada sediaan histologis uterus dari setiap ekor mencit masing masing 1 titik. 1 titik terdiri dari 5 sayatan. Setiap satu sayatan dilakukan pengamatan

dengan pengulangan pengukuran masing-masing 8 kali seperti pada gambar 3.2. Selanjutnya dilakukan rata – rata terhadap tebal endometrium uterus.



Gambar 3.2 Skema Pengukuran Tebal Endometrium.

3.5.4. Analisa Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah berat uterus dan tebal endometrium pada gambaran histologi. Data hasil penimbangan berat uterus dan tebal endometrium yang didapatkan kemudian diuji statistik sesuai dengan penelitian Agustini (2007) yakni diuji normalitas dan homogenitasnya dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan diuji homogenitasnya dengan Uji Homogenitas Lavene. Semua data terdistribusi normal dan homogen ($\alpha = 0,05$) kemudian dianalisis dengan Uji ANOVA (Analysis of Variance) One Way $\alpha = 1\%$, dianalisis dengan menggunakan program SPSS 16.0. Apabila terdapat perbedaan signifikan maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf signifikansi 1%. Untuk mengetahui hubungan antara berat uterus dan tebal endometrium juga dilakukan Uji Regresi Linier dan Korelasi Pearson dengan taraf signifikansi 1%.