

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang pengaruh ekstrak daun katu (*Sauropus androgynus* (L.). Merr) terhadap proliferasi epitel vagina dan panjang fase diestrus serta metestrus mencit (*Mus musculus*) betina premenopause merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 4 perlakuan dan ulangan, yaitu:

1. Kelompok kontrol (-) yakni mencit betina normal dengan induksi prostaglandin dengan dosis menurut (Nadhifah, 2010) yakni 5 mg/ml.
2. Kelompok kontrol (+) mencit dengan induksi VCD dengan pemberian aquadest secara oral.
3. Kelompok perlakuan (P1) yaitu kelompok dengan perlakuan pemberian ekstrak air daun katu (*Sauropus androgynus* (L.). Merr) dengan dosis 15 mg/kgBB.
4. Kelompok perlakuan (P2) yaitu kelompok dengan perlakuan pemberian ekstrak air daun katu (*Sauropus androgynus* (L.). Merr) dengan dosis 30 mg/kgBB.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2013 – Agustus 2014 di Laboratorium Fisiologi Hewan, Laboratorium Hewan Coba dan Laboratorium Optik, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang. Simplisia daun katu diperoleh dari Balai

Meteria Medika, Batu, Malang. Sedangkan 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 terdiri dari 3 variabel yang meliputi :

1. Variabel bebas : dosis ekstrak air daun katu dengan berbagai konsentrasi yaitu 15 mg/kgBB dan 30 mg/kgBB.
2. Variabel terkontrol : mencit (*Mus musculus* L.) betina strain Balb/C usia 2 bulan 1 minggu dan berat sekitar 21-25 gr.
3. Variabel terikat : proliferasi epitel dinding vagina dan panjang fase diestrus mencit (*Mus musculus* L.) betina premenopause.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat-Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat bedah, kandang pemeliharaan (bak plastik), seperangkat alat gelas (gelas ukur 25 ml, beaker glass 25 ml, beaker glass 50 ml, beaker glass 100 ml, pipet volume 5 ml), bola hisap, mikropipet 100-1000 μ l, *blue tip*, timbangan analitik, objek glass, mikroskop computer, alat suntik disposable 1 ml 27 G, spuit oral 1 ml 23 G, *hand glove*, masker, object glass dan mikrotom.

3.4.2 Bahan-Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mencit strain Balb/c , VCD (*4-Vinylcyclohexene dioxide*) (*Ted Pella, Inc.*) yang disimpan dalam suhu

-20⁰ C, ekstrak air daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.). Merr), minyak wijen, kapas, tissue, kloroform, paraffin, pewarna Giemsa, Buffer Giemsa, Alkohol 70%, NaCL 0,9%, prostaglandin (Prolyse, *Meyer Laboratories*), pewarna Hematoxylin Eosin (HE), pakan pellet kode SP, dan sekam kayu.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Persiapan Hewan Coba

Persiapan yang dilakukan yaitu:

1. Mencit yang digunakan adalah mencit strain Balb/c berumur 28 hari dengan jumlah 42 ekor.
2. Hewan coba diaklimatisasi selama 1 minggu sebelum perlakuan di kandang dengan fotoperiode 12-12 jam siklus gelap terang pada suhu 22±2⁰ C.
3. Selama proses aklimatisasi, mencit diberi makan pellet kode SP dan diberi minum secara *adlibitum* (berlebih) setiap hari.
4. Setelah aklimatisasi, ditimbang berat badan mencit dan dilakukan pengelompokan sesuai kode kandang kelompok perlakuan dengan distribusi mencit dengan berat badan secara acak.
5. Mencit yang siap digunakan untuk proses penelitian adalah dengan kisaran berat badan 21 – 25 gram.
6. Mencit yang digunakan berjumlah 30 ekor dari 42 mencit untuk penelitian.

3.5.2 Perhitungan Dosis dan Pembuatan Larutan VCD

Dosis VCD yang digunakan adalah 160 mg/kgBB. Hal ini merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Muhammad, et al (2009), bahwa dengan dosis 160 mg/kgBB selama 12 hari dapat mereduksi folikel primordial sampai 90% dan folikel primer sampai 99%. Kempen (2011) menyatakan bahwa pemberian dosis rendah 160 mg/KgBB selama 10 hari dalam 14 hari (5 kali seminggu dalam 14 hari) telah menyebabkan 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. Injeksi yang digunakan 0,5 ml. 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 :

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

Volume x Konsentrasi VCD Stock = Volume x Konsentrasi larutan VCD Perlakuan

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

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

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

Jadi, 1,344 mg/ml VCD diencerkan dengan minyak wijen sampai 210 ml dengan menambahkan 208,656 ml pelarut minyak wijen. Stock larutan VCD disimpan refrigerator dengan suhu 5⁰ C.

3.5.3 Pemberian Perlakuan Larutan VCD

1. Diinjeksikan dengan spuit sebanyak 0,5 ml secara intraperitoneal sesuai dengan kelompok perlakuan. Metode Intraperitoneal menurut Kusumawati (2004) adalah disuntik di quadrant kiri bawah abdomen untuk menghindari organ-organ vital. Jarum dimasukkan sejajar dengan kakinya kemudian didorong melalui dinding abdomen ke dalam rongga peritoneal.
2. Pemberian VCD selama 10 hari dalam 14 hari. Kempen (2011) menyatakan bahwa pemberian VCD dosis rendah 160 mg/KgBB selama 10 hari dalam 14 hari (5 kali seminggu dalam 14 hari) menyebabkan apoptosis pada folikel primer dan primordial.
3. Larutan disimpan dalam kulkas.

3.5.4 Penyerentakan Siklus Birahi

Sebelum diberikan perlakuan maka perlu dilakukan penyerentakan birahi. Hal ini dilakukan karena hewan coba yang digunakan berjenis kelamin betina yang cenderung dipengaruhi oleh siklus birahi. Injeksi maksimal untuk intramuscular pada mencit adalah 0,01 ml (Kusumawati, 2004). Penyerentakan dilakukan dengan memberikan hormon prostaglandin sebanyak 0,5 mg yang diinjeksikan secara intramuscular sebanyak 0,1 ml (Nadhifah, 2010). Penggunaan progesterone berfungsi untuk memperpanjang fase luteal sampai korpus luteum secara alami (Sutiyono.dkk, 2008).

Prostaglandin yang diberikan pada mencit adalah sesuai dengan dosis yang tertera pada botol yakni 11 mg/2 ml atau 5,5 mg/ml, dengan pemberian sebanyak

0,5 ml pada anjing. Kemudian dikonversi dengan 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.

3.5.5 Pembuatan Ekstrak Air Daun Katu

Pembuatan ekstrak air daun katu (*Sauropus androgynus* (L.). Merr) dilakukan melalui tahapan-tahapan sesuai penelitian Prishandono (2009) yaitu :

1. Simplisia daun katu dan air di campur dengan perbandingan 1:2 (b/v)
2. Campuran tersebut direbus 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 aquades 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 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.

Sedangkan 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.

3.5.6 Perhitungan Dosis Ekstrak Air Daun Katu

Ekstrak katu yang dibutuhkan menurut Wiyasa,dkk (2008), bahwa fitoestrogen jenis isofalvon genistein dan daidzein dari ekstrak tokbi (*Pueraria lobata*) yang berefek optimal adalah dosis 30 mg/kgBB/hari. Penelitian ini menggunakan Pada penelitian ini menggunakan 3 dosis yang berbeda yaitu :

1. Dosis I: 0 mg/kgBB atau 0 mg/ekor/hari
2. Dosis II : 15 mg/kgBB atau 0,3375 mg/ekor/hari
3. 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

- V_1 = Volume dosis yang dibuat

- M_2 = Konsentrasi dosis stok

- V_2 = Volume dosis stok

3.5.7 Pembagian Kelompok Sampel

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

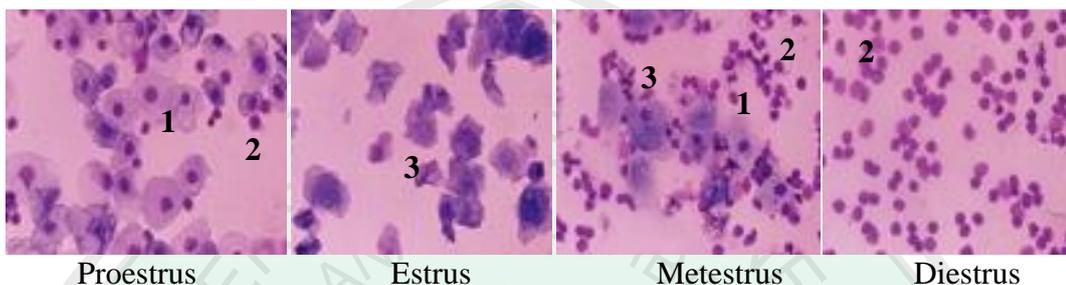
1. Kelompok I (Kontrol negatif, induksi Prostaglandin)
2. Kelompok II (Kontrol positif, pemberian VCD, tanpa terapi)
3. Kelompok III (VCD + Ekstrak air daun katu 15 mg/kgBB)
4. Kelompok IV (VCD + Ekstrak air daun katu 30 mg/kgBB)

3.5.8 Pengecekan Siklus Estrus

Pengecekan siklus estrus pada mencit dilakukan dengan metode apusan vagina sesuai dengan penelitian Sitasiwi (2009). Apusan vagina diambil dengan sedikit larutan NaCl 0,9% dengan pipet (0,9 g NaCl serbuk dalam 100 ml aquades). Larutan NaCl di dalam pipet dimasukkan kedalam vagina mencit dan langsung dihisap kembali dengan cepat. Apusan vagina yang sudah diambil diletakkan di object glass lalu di warnai dengan pewarna GIEMSA yang sudah diencerkan. Menurut Nadhifah (2010) pengenceran pewarna GIEMSA dengan Buffer GIEMSA dengan perbandingan 1:9. Pewarnaan dilakukan selama 30 menit, lalu di bilas dengan air mengalir dan ditunggu hingga kering. Kelebihan air diserap dengan tissue.

Hasil preparat apusan vagina diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x dan dicatat fase-fase pada setiap preparat masing-masing mencit. Penentuan fase pada siklus estrus dengan melihat perbandingan sel epitel berint, sel epitel menanduk (kornifikasi), dan leukosit pada hasil apusan vagina (Sitasiwi.2009). Hasil apusan vagina diamati dibawah mikroskop, dan

dibandingkan antara mencit normal dan mencit yang diberi perlakuan VCD. Menurut Craig *et al* (2010), kerusakan pada ovarium yang diakibatkan oleh VCD ditunjukkan dengan siklus estrus yang memanjang dengan panjang fase diestrus yang melebihi fase normal (> 120 jam) dan terus-menerus.



Proestrus

Estrus

Metestrus

Diestrus

Gambar 3.1 Pengamatan Siklus Estrus Mencit dengan Apusan Vagina.

Keterangan : 1. Sel epitel berinti, 2 Sel leukosit, 3. Sel kornifikasi (Rasad, 2012).

Keterangan apusan vagina dari Akbar (2010) yang disimpulkan dari Dalal *et.al* (2001); Smith & Mangkoewidjojo (1988); Nalbandov (1999) dan Syahrums, *et.al.* (1994) adalah:

1. Fase proestrus : lama fase ini adala 12 jam, ditandai dengan sedikit sel leukosit dan banyaknya sel epitel berinti.
2. Fase estrus : lama fase ini adala 12 jam, ditandai dengan banyaknya sel kornifikasi.
3. Fase metestrus : lama fase ini adala 12 jam, ditandai dengan adanya sel kornifikasi serta sedikit sel leukosit dan sel epitel berinti.
4. Fase diestrus : lama fase ini adala 72 jam, ditandai dengan banyaknya sel leukosit dan sedikit sel epitel berinti (jika ada).

3.5.9 Pemberian Perlakuan Ekstrak Air Daun Katu

Pemberian perlakuan ekstrak air daun katu adalah dengan diinjeksi hewan coba dengan spuit secara gavage / oral sesuai dengan kelompok perlakuan selama

30 hari. Metode oral menurut Kusumawati (2004) yaitu dengan memakai jarum dengan ujung tajamnya telah dimodifikasi dengan ditambahkan dengan bentuk bundar untuk kemudian dimasukkan ke dalam mulut.

3.6 Pengambilan Data

3.6.1 Dislokasi Hewan Coba dan Pengambilan Vagina

Dislokasi hewan coba dan pengambilan vagina dilakukan setelah pengecekan siklus estrus dan setelah pemberian perlakuan ekstrak air daun katuk selama 30 hari. Pengecekan siklus estrus bertujuan untuk memastikan keseragaman fase diestrus agar dapat dilakukan perbandingan histologi vagina normal dengan vagina yang diberi perlakuan. Pada saat dibedah, semua mencit dalam fase diestrus.

Langkah yang dilakukan dalam dislokasi hewan coba adalah dipersiapkan alat dislokasi dan mencit. Kemudian, mencit dibius dengan dimasukkan dalam toples yang berisi kapas berkloroform. Mencit yang sudah pingsan dikeluarkan dan diletakkan pada papan bedah. Lalu, dikeluarkan vagina dari tubuh mencit dan diletakkan dalam toples kecil berisi cairan PBS.

3.6.2 Pembuatan Preparat Vagina Mencit Betina Premenopause

Sampel dinding vagina yang sudah diambil, dilakukan pemeriksaan histologist untuk melihat penebalan epitel vagina. Pada pengamatan mikroskopis sayatan dinding vagina dengan pewarnaan Hematoksilin eosin (Raden, 2011).

Pembuatan preparat vagina melalui beberapa tahapan yaitu :

1. Tahap Fiksasi

Pada tahap ini, vagina difiksasi pada larutan formalin 10% selama 1 jam, diulang sebanyak 2 kali pada larutan yang berbeda.

2. Tahap Dehidrasi

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

3. Tahap Clearing (Penjernihan)

Vagina yang telah didehidrasi sebelumnya, diclearing agar ethanol yang digunakan dalam tahap dehidrasi hilang dengan menggunakan larutan xylene selama 1,5 jam dan dilanjutkan ke larutan xylene II selama 1,5 jam.

4. Tahap Embedding

Pada tahapan ini, vagina dimasukkan dalam kaset dan diinfiltrasi dengan menuangkan paraffin yang dicairkan pada suhu 60⁰ C. kemudian paraffin dibiarkan mengeras dan dimasukkan ke dalam freezer selama ±1 jam.

5. Tahap Sectioning (Pemotongan)

Pada tahap ini, vagina yang sudah mengeras dilepaskan dari kaset dan dipasang pada mikrotom, kemudian dipotong setebal 5 micron dengan pisau mikrotom. Hasil potongan dimasukkan ke dalam waterbath bersuhu 40⁰ C untuk merentangkan hasil potongan. Hasil potongan kemudian diambil dengan objek glass dengan posisi tegak lurus dan dikeringkan.

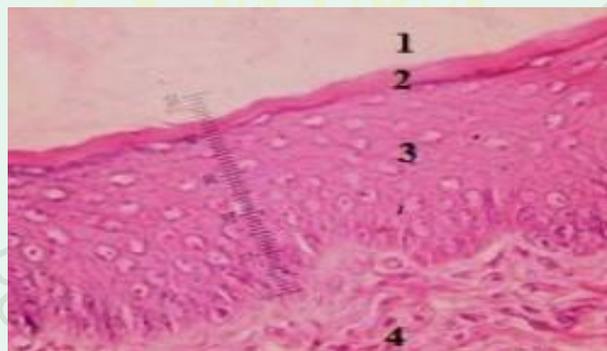
6. Tahap Staining (Pewarnaan)

Hasil potongan diwarnai dengan hematoxilin eosin (pewarnaan HE) melalui tahapan berikut :

- a) Preparat direndam dalam larutan xylene I selama 10 menit.
- b) Preparat diambil dari xylene I dan direndam dalam larutan xylene II selama 5 menit.
- c) Preparat diambil dari xylene II dan direndam dalam ethanol absolut selama 5 menit.
- d) Preparat diambil dari ethanol absolut dan direndam dalam ethanol 96% selama 30 detik.
- e) Preparat diambil dari ethanol 96% dan direndam dalam ethanol 50% selama 30 detik.
- f) Preparat diambil dari ethanol 50% dan direndam dalam running tap water selama 5 menit.
- g) Preparat diambil dari running tap water dan direndam dalam meyer hematoshirin selama 1-5 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 selama 1-5 menit.
- j) Preparat diambil dari larutan eosin kemudian dimasukkan dalam ethanol 75% selama 5 detik, kemudian dimasukkan ke dalam ethanol

absolut selama 5 detik dan diulang 3 kali pada ethanol absolut yang berbeda.

- k) Preparat diambil dan direndam dalam xylene III selama 5 menit, kemudian dipindahkan dalam xylene IV selama 5 menit dan terakhir dipindahkan ke dalam xylene V selama 10 menit.
- l) Preparat diangkat dan dikeringkan. Kemudian, ditutup menggunakan deck glass dan hasil preparat yang sudah dibuat dibandingkan dengan literatur. Atrofi pada hewan coba dapat diamati pada histologi dinding vagina yang tinggal lapisan epitel sel parabasal. Preparat diamati dengan perbesaran 400x (Raden, 2011).



Gambar 3.2: Gambaran histologi epitel vagina pada tikus normal. Keterangan : (A) 1. Lumen vagina, 2. Epitel vagina yang mengalami kornifikasi, 3. Epitel berlapis pipih, 4. Lapisan muskularis. Perbesaran 400x (Purnamasari, Hayati, dan Darmanto, 2012).

Kriteria penentuan siklus estrus berdasarkan gambaran perubahan bentuk

epitel vagina (Nalley, dkk, 2011) :

No	Sel epitel	Bentuk sel	Fase
1	Sel Parabasal (Leukosit)	Sel kecil, bulat dengan inti besar	Diestrus
2	Sel Intermediat (Epitel berinti)	Sel lebih besar daripada sel parabasal dengan inti yang lebih kecil	Diestrus - proestrus
3	Sel Superfisial (Epitel kornifikasi)	Sel besar, berbentuk poligonal inti yang sangat kecil atau tanpa inti	Proestrus - estrus

3.7 Analisis Data

Data panjang fase diestrus mencit premenopause dianalisis dengan menggunakan ANOVA, dan jika terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji lanjut (Duncan Test) (Nursyah, 2012).

Ketebalan epitel vagina dihitung dengan menggunakan aplikasi Image Raster dimulai dari tepi lume. Hal ini diulang sampai 8 kali lapang pandang pada 1 gambar preparat yang bagus perkelompok perlakuan. Kemudian, data tebal epitel vagina yang diperoleh di uji dengan evaluasi maturasi sel dengan cara menghitung jumlah sel parabasal (PB), sel Intermediet (I), dan sel superfisial (F) dan di tampilkan dalam rasio PB:I:S. Evaluasi maturasi sel dihitung di bawah mikroskop dengan menghitung jumlah dari sel parabasal, intermediat, dan superfisial dalam satu pandang. Hal ini diulangi sampai 8 lapang pandang dalam 1 preparat. Jumlah sel parabasal kemudian dikalikan 0, jumlah sel intermediat dikalikan 0,5, dan jumlah sel superfisial dikalikan 1. Ketiganya lalu dijumlah, diperoleh hasil untuk jumlah sel yang matur (Immanuel, *et al*, 2010). Tabel indeks maturasi (IM) dapat dilihat pada tabel 2.3. Data indeks maturasi per perlakuan dianalisis dengan SPSS.

Data hasil analisis sel dikelompokkan berdasarkan fase siklus estrus dan ditabulasi dalam persentase (0-100%), kemudian dianalisis secara deskriptif (Nalley,dkk, 2011). Gambaran sel yang diperoleh didokumentasi menggunakan mikroskop kamera.