

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian yaitu hewan mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster yang diberi beberapa perlakuan, sehingga jenis penelitian ini termasuk ke dalam *penelitian eksperimental* (Nazir, 2003). Adapun yang menjadi objek penelitian adalah pemberian ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) atau akuades terhadap perkembangan embrio praimplantasi mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster.

B. Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan adanya kelompok mencit yang diberi perlakuan dan kelompok mencit kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Penelitian ini dilakukan dengan cara memberikan ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) atau akuades kepada mencit dengan cara *gavage*. Kelompok perlakuan terdiri dari 3 kelompok yang masing-masing kelompok diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak kunyit (*Curcuma domestica* Val.) dengan dosis 140 mg/Kg bb/hari, 280 mg/Kg bb/hari, dan 700 mg/Kg bb/hari (Yadav dan Jain, 2010). Selain itu, terdapat pula kelompok kontrol yang terdiri dari kelompok mencit yang perlakuannya hanya diberi akuades.

Jumlah sampel pengulangan dihitung dengan rumus Federer, (1955):

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

$$(4-1) (n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15+3$$

$$n \geq \frac{18}{3}$$

$$n \geq 6$$

Ket: T = jumlah perlakuan

n = jumlah replikasi

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah hewan uji dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan dengan pengulangan setiap perlakuan adalah ≥ 6 ekor. Hewan uji yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster yang akan diberi perlakuan ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) secara *gavage*. Pengacakan hewan uji mencit dilakukan untuk menghilangkan bias (Sudjana, 2002). Gambar pengacakan hewan uji dapat dilihat pada Gambar 3.1.

1 A 23	2 C 17	3 D 10	4 A 14
5 B 4	6 C 13	7 B 21	8 C 6
9 B 9	10 D 24	11 B 5	12 A 2
13 C 18	14 B 1	15 A 16	16 D 22
17 C 12	18 C 11	19 A 19	20 D 7
21 D 20	22 D 3	23 B 8	24 A 15

Gambar 3.1. Hasil Pengocokan Mencit dan Jenis Perlakuan

Kelompok perlakuan diantaranya:

- A = Kontrol, dengan diberi akuades
- B = Diberi ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) dengan dosis 140 mg/kg bb/hari
- C = Diberi ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) dengan dosis 280 mg/kg bb/hari
- D = Diberi ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) dengan dosis 700 mg/kg bb/hari

Berdasarkan Gambar 3.1. maka diperoleh peta kandang yang sebagai berikut:

Tabel 3.1 Peta kandang mencit

Kandang	Nomor mencit					
A	2	9	15	3	16	23
B	5	1	4	17	13	11
C	21	18	22	14	8	7
D	6	12	19	24	20	10

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster yang ada di Rumah Mencit Kebun Botani FPMIPA UPI. Sedangkan sampel penelitian ini adalah mencit betina virgin yang berumur delapan sampai sepuluh bulan yang mempunyai berat badan 25-31 gram.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari – September 2014. Pembedahan untuk koleksi embrio dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan dan pemeliharaan hewan uji serta pembuatan ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) dilakukan di Rumah Hewan Kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

E. Alat dan bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Struktur Hewan FPMIPA dan Rumah Hewan Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia. Alat dan bahan yang digunakan saat tahap aklimatisasi dan pemberian perlakuan diantaranya adalah kandang hewan uji dengan penutupnya sebanyak enam kandang, timbangan analitik juga digunakan untuk menimbang berat badan mencit. Mencit yang akan digunakan berjumlah 24 ekor mencit betina dan enam ekor mencit jantan. Selama tahap ini, mencit diberi makan dengan pur babi dan minum secara *ad libitum*.

Setelah mencit diaklimatisasi mencit akan dikawinkan, tapi mencit akan disuntik dengan hormon untuk memicu ovulasi. Alat dan bahan yang digunakan adalah *syringe* 1 ml, hormon Chorulon dan hormon Fostimon yang akan diencerkan dengan pelarut NaCl 0,9%. Pada tahap selanjutnya, mencit diberi perlakuan ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) atau akuades secara oral dengan menggunakan jarum *gavage* dan *syringe* 1 ml

Pada tahap selanjutnya, yaitu pembedahan dan koleksi embrio dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan FPMIPA UPI. Alat dan bahan yang digunakan diantaranya adalah alat bedah seperti pisau bedah, gunting bedah, bak bedah, dan pinset. Pada tahap koleksi embrio digunakan teknik *flushing* (membilas) dengan menggunakan *syringe* 1 ml, pipet, cawan petri dan gelas arloji untuk menampung embrio. Selain itu digunakan medium NaCl 0,9 untuk membilas bagian uterus dan medium PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebagai larutan fisiologis untuk embrio mencit. Embrio diamati menggunakan mikroskop. Kamera juga dipakai untuk mendokumentasikan hasil penelitian berupa tahapan embrio praimplantasi. Alat dan bahan yang digunakan selengkapnya ada pada Lampiran 4.

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Pemeliharaan hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster yang dikembangbiakan di Rumah Hewan Kebun Botani UPI. Hewan uji diaklimatisasi selama satu minggu dengan diberi pakan dan minum secara *ad libitum*. Hewan uji mendapatkan pakan standar untuk anak babi CP 551. Mencit dipelihara dalam kandang bak plastik ukuran 30x20x12cm yang beralaskan sekam padi dan ditutup dengan kawat. Setiap kandang berisi enam ekor mencit. Suhu pada ruangan berkisar antara 25°C - 28°C. Kelembaban relatif ruangan berkisar antara 78% - 89%. Ruang penyimpanan mencit mendapatkan siklus terang dan gelap. Hewan dinyatakan sehat jika tidak mengalami perubahan berat badan lebih dari 10% dan perilakunya terlihat normal. Mencit dewasa seksual

yang digunakan adalah mencit jantan berumur 10–14 minggu dan mencit betina berumur 9–12 minggu dengan berat badan 25– 31 gram (Priyandoko, 2003).

b. Pembuatan ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.)

Rimpang kunyit berasal dari Balittro (Balai Tanaman Obat dan Rempah) yang berumur sekitar satu tahun. Pembuatan rimpang kunyit dilakukan berdasarkan Halim *et al.*, (2012) yang menggunakan teknik *aqueos extract*. Pertama-tama rimpang dicuci bersih lalu dirajang dan dijemur sampai kering. Hasil rajangan diblender lalu diayak, hasil ayakan berupa bubuk kunyit. Selanjutnya bubuk kunyit diekstrak dengan air hangat bersuhu 60°C selama 30 menit, perbandingan antara kunyit dan air adalah 1:16. Ekstrak disaring dan ekstrak cair yang diperoleh diekstrak kembali sebanyak dua kali dengan cara yang sama. Setelah itu hasil ekstraksi disimpan dalam wadah datar lalu dikering anginkan sampai mendapat endapan berwarna coklat kemerahan. Hasil endapan yang sudah kering ditumbuk hingga halus. Selesai ditumbuk, ekstrak bubuk dapat digunakan.

c. Penentuan besar dosis perlakuan

Penentuan dosis ditentukan dengan menimbang ekstrak terlebih dahulu. Rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) hasil ekstraksi ditimbang menggunakan timbangan analitik untuk setiap dosisnya. Setelah ditimbang ekstrak dimasukkan ke dalam kertas dosis. Apabila ekstrak ini akan digunakan maka ekstrak dilarutkan dengan akuades. Pada penelitian ini digunakan dosis untuk mencit sebesar 0 mg/kg bb/hari, 140 mg/kg bb/hari, 280 mg/kg bb/hari dan 700 mg/kg bb/hari. Pemberian dosis ini mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Yadav dan Jain (2010). Perhitungan lebih lengkap terlampir (Lampiran 2).

Konsentrasi masing-masing dosis dilakukan dengan perhitungan:

1. Kontrol

Mencit di-*gavage* dengan akuades sebanyak 0,3 ml setiap harinya.

2. 140 mg/kg bb/hari

Mencit di-*gavage* dengan 3,78 mg ekstrak yang dilarutkan dalam akuades hingga 0,3 ml.

3. 280 mg/kg bb/hari

Mencit di-*gavage* dengan 5,6 mg ekstrak yang dilarutkan dalam akuades hingga 0,3 ml.

4. 700 mg/kg bb/hari

Mencit di-*gavage* dengan 18,9 mg ekstrak yang dilarutkan dalam akuades hingga 0,3 ml.

2. Tahap Perlakuan

a. Pemberian hormon

Mencit yang akan diberi perlakuan dibuat ovulasi terlebih dahulu. Proses ovulasi ini dipicu dengan cara menginjeksikan hormon secara intraperitoneal. Hormon yang digunakan adalah FSH yaitu Foligon dan hormon hCG yaitu Chorulon masing-masing dengan dosis 5 I.U/ekor sebanyak 0,1 ml. Hormon di larutkan terlebih dahulu untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan (Lampiran 3). Penyuntikan hormon FSH dilakukan pada sore hari sekitar pukul 15.00. Penyuntikkan hormon hCG dilakukan 48 jam kemudian dan mencit langsung dikawinkan dengan perbandingan 1:1.

b. Pengawinan mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster

Mencit dikawinkan dengan perbandingan mencit betina dan mencit jantan 1:1 (IUACC, 2009). Pengawinan ini dilakukan pada sore hari yaitu sekitar pukul 16.00 dan pada pagi harinya sekitar pukul 07.00 dilihat ada atau tidaknya *vaginal plug* (sumbat vagina). Sumbat vagina ini berwarna putih susu yang menempel pada vagina mencit dan merupakan campuran sekret vesikula seminalis betina dengan ejakulat jantan yang mengeras. Bila ada sumbat vagina maka ditetapkan bahwa mencit tersebut sudah kopulasi dan hamil hari ke-0. Mencit tersebut lalu dipisahkan dan mulai di-*treatment* dengan ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.).

c. Pemberian ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.)

Treatment dengan pemberian ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) ini dilakukan sebanyak 4 kali sejak hari ke-0 setelah ditemukannya sumbat vagina sampai hari ke-3. Pemberian ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) dilakukan dengan menggunakan jarum *gavage*. Ekstrak yang diberikan pada mencit sebanyak 0,3 ml dengan dosis yang berbeda-beda pada setiap kelompok yaitu dosis 0 mg/kg bb/hari (dengan pemberian akuades saja), 140 mg/kg bb/hari, 280 mg/kg bb/hari dan 700 mg/kg bb/hari. Setelah *treatment* selesai maka pada hari ke-3,5 mencit di-dislokasi leher, dibedah dan organ reproduksi diisolasi untuk tahap selanjutnya.

3. Tahap Pengamatan

a. Koleksi embrio praimplantasi

Setelah *treatment* selesai diberikan, mencit di-dislokasi leher dan dibedah di Laboratorium Struktur Hewan FPMIPA UPI. Oviduk, uterus, dan ovarium dipisahkan dan ditempatkan di cawan petri yang berisi larutan NaCl 0,96% untuk dibersihkan dari jaringan lemak yang menepel dan memisahkan ovarium dari uterus. Koleksi embrio dilakukan dengan cara membilas (*flushing*) lumen uterus. Uterus yang berada di cawan petri dipindahkan ke kaca arloji dan di-*flushing* oleh *syringe* berukuran 1 ml yang berisi medium PBS pH 7,2 (Hogan *et al.*, 1986). Medium PBS ini merupakan larutan fisiologis yang umum digunakan sebagai pelarut dalam penelitian. Hal ini dilakukan supaya sel terjaga osmolalitasnya. Hal ini disadasi karena *Phosphate Buffered Saline* yang mengandung CaCl_2 mampu menjaga osmolalitas sel (Freshney, 2005). Langkah selanjutnya embrio yang sudah keluar dari uterus diamati menggunakan mikroskop.

b. Perhitungan dan pengamatan tahapan embrio praimplantasi serta pengukuran diameter embrio tahap blastokista (*Mus musculus*)

Setelah koleksi embrio, perhitungan dan pengamatan dilakukan terhadap tahap-tahap perkembangan embrio praimplantasi, embrio abnormal dan ukuran diameter blastokista mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster. Tahapan perkembangan embrio praimplantasi meliputi embrio pembelahan satu sampai delapan sel, morula belum mampat, morula mampat, blastokista awal dan blastokista akhir. Sedangkan untuk embrio abnormal terdiri dari embrio degenerasi, embrio fragmentasi, blastokista tanpa zona pelusida, morula tanpa zona pelusida, embrio dengan dua blastocoel, embrio dengan blastomer tidak sama besar dan zona pelusida tanpa embrio. Pada tahap pengukuran diameter blastokista digunakan lensa yang berukuran dengan skala 0-100 mm. Diameter blastokista diukur bagian horizontal dan vertikal.

4. Analisis Data

Ada dua macam analisis data yaitu yang dilakukan yaitu secara kualitatif dan kuantitatif. Untuk analisis kualitatif digunakan analisa tahapan pada embrio praimplantasi seperti embrio awal (1-8 sel), morula tidak mampat, blastokista awal, blastokista sedang dan embrio tahap blastokista akhir (Sumarmin *et al*, 1999). Selain itu dilihat keadaan embrio abnormal dan dianalisis jenisnya. Embrio blastokista juga diukur diameternya.

Untuk analisis data secara kuantitatif, data yang diperoleh pertama-tama diolah dengan menggunakan uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov*. Uji ini bertujuan untuk melihat normal atau tidaknya distribusi data yang didapatkan. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas *Levene* untuk mengetahui variansi yang didapat homogen atau tidak. Lalu uji selanjutnya dilakukan jika H1 diterima, yaitu dengan menggunakan uji *Annova*. Hal ini dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan pada masing-masing perlakuan dengan kontrol. Apabila data yang didapatkan berupa data non parametrik, maka data dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*.

5. Alur Penelitian

