

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk ke dalam jenis penelitian eksperimental, yaitu merupakan penelitian yang di dalamnya terdapat perlakuan untuk memanipulasi beberapa variabel terhadap objek penelitian dan juga disertai kontrol (Nazir, 2003).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan menggunakan metode Rancang Acak Lengkap (RAL). Penempatan mencit pada setiap kelompok dilakukan secara random/acak. Perlakuan yang dilakukan meliputi pemberian ekstrak temu putih pada masing-masing 3 kelompok perlakuan serta kelompok kontrol. Dosis ekstrak temu putih yang digunakan yaitu 140 mg/kgBB/hari, 280 mg/kgBB/hari dan 700 mg/kgBB/hari, serta dosis 0 mg/kgBB/hari merupakan kontrol yang hanya diberi akuades setiap harinya. Banyaknya pengulangan kelompok perlakuan diperoleh dari perhitungan dengan rumus $(T - 1)(n - 1) \geq 15$ dimana T adalah jumlah perlakuan dan n adalah jumlah pengulangan (Federer, 1983). Berikut adalah rumusan dan perlakuan yang digunakan yaitu dengan rumus Federer (1983).

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

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

$$n \geq 6 \text{ ekor}$$

Dari perhitungan di atas maka penelitian dilakukan sebanyak 6 kali pengulangan. Mencit yang digunakan dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan pemberian ekstrak temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.). Pengacakan dilakukan untuk menghilangkan bias. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini yaitu jumlah tapak implantasi, jumlah fetus serta berat dan panjang badan fetus. Data

diolah dengan menggunakan *Software SPSS Release for Window* versi 18 dengan menggunakan *Test of Normality (Kolmogorov-Smirnov)* dan *Test of Homogeneity of Variances (Levene Statistic)* untuk mengetahui apakah data yang telah didapatkan homogen dan terdistribusi normal. Data yang telah didapatkan diuji dengan menggunakan uji *Kruskall-Wallis* untuk menguji rerata pada tiap kelompok perlakuan, uji lanjutan dilakukan dengan Uji *Mann-Whitney*. Penempatan mencit secara acak dilakukan dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Berikut merupakan tabel Rancangan Acak Lengkap (RAL) untuk menentukan kelompok perlakuan pada mencit disajikan pada Tabel 3.1. Hasil Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang telah didapatkan Setelah itu dari hasil RAL tersebut, maka didapatkan pula peta kandang mencit untuk penempatan tiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (Tabel 3.2).

Tabel 3.1. Hasil pengundian nomor mencit dan jenis perlakuan (Rancangan Acak Lengkap) kelompok kontrol dan perlakuan ekstrak rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.)

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

Keterangan :

A : Kontrol (0 mg/kgBB/hari)

B : Diberi ekstrak rimpang temu putih dengan dosis 140 mg/kgBB/hari

C : Diberi ekstrak rimpang temu putih dengan dosis 280 mg/kgBB/hari

D : Diberi ekstrak rimpang temu putih dengan dosis 700 mg/kgBB/hari

1,2,3 dst: Nomor mencit

Tabel 3.2. Peta kandang mencit kelompok kontrol dan perlakuan ekstrak rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.)

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

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh mencit (*Mus musculus* L.) betina galur Swiss Webster yang dipelihara di Rumah Hewan Kebun Botani UPI sedangkan sampel yang digunakan dalam penelitian adalah mencit (*Mus musculus* L.) Swiss Webster betina bunting yang diberi perlakuan ekstrak rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.).

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 8 bulan yaitu pada bulan Maret hingga Oktober 2014. Pembuatan ekstrak temu putih dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Pemeliharaan mencit dilakukan di Rumah Hewan Kebun Botani FPMIPA UPI yang sudah terkondisikan, pembedahan dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan FPMIPA UPI.

E. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan sebagai penunjang penelitian adalah mencit betina dara dan mencit jantan (*Mus musculus* L.) Swiss Webster 24 pasang, rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.), akuades sebagai pelarut ekstrak, NaCl 0,9%, NaOH 2%, jarum *gavage*, *syringe* 1 ml, neraca analitik, kertas milimeter blok serta 1 set alat bedah. Alat dan bahan selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 5.

F. Prosedur Penelitian

Prosedur pada penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, yaitu:

1. Aklimatisasi mencit

Mencit yang merupakan hewan uji dipelihara di rumah mencit yang berada di Kebun Botani FPMIPA UPI. Sebelum masuk ke tahap perlakuan, mencit diaklimatisasi atau diadaptasikan di lingkungan kandang selama kurang lebih satu minggu. Tujuan aklimatisasi ini yaitu agar hewan uji teradaptasi dengan kondisi yang akan ditempati selama percobaan. Selama aklimatisasi, semua kelompok diberi pakan standar mencit dan minum secara *ad libitum* serta dipelihara dalam suhu ruangan yang berkisar 25 °C dengan ventilasi udara yang cukup memadai (Sposito dan Santos, 2011). Kandang dibersihkan sebanyak satu minggu sekali.

2. Penentuan dosis ekstrak

Dosis ekstrak temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) yang diberikan sebagai perlakuan yaitu 0 mg/kgBB/hari, 140 mg/kgBB/hari, 280 mg/kgBB/hari dan 700 mg/kgBB/hari. Dosis ekstrak ini didasarkan pada penelitian Yadav dan Jain (2010) yang melakukan penelitian dengan ekstrak air *Curcuma longa* yang diberikan secara oral terhadap tikus betina dan dilaporkan bersifat kontraseptif karena 100% memiliki aktivitas antiimplantasi. Dosis yang diberikan pada tikus tersebut yaitu 100 mg/kgBB/hari, 200 mg/kgBB/hari dan 500 mg/kgBB/hari sehingga jika dikonversi pada mencit maka setara dengan dosis 140 mg/kgBB/hari, 280 mg/kgBB/hari dan 700 mg/kgBB/hari.

3. Pembuatan ekstrak temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.)

Rimpang temu putih dicuci hingga bersih, kemudian masing-masing jenis rimpang diiris tipis-tipis lalu dikeringkan. Kemudian potongan rimpang temu putih kering dibuat menjadi serbuk kasar dengan cara diblender. Serbuk kasar tersebut kemudian disaring dengan ayakan untuk mendapatkan serbuk yang lebih halus, setelah itu serbuk dilarutkan dengan air hangat (60°C) dengan perbandingan 1 : 16, kemudian residu serbuk rimpang diekstraksi kembali sebanyak dua kali (Halim *et al.*, 2012). Campuran hasil ekstraksi kemudian

ditempatkan di dalam wadah kemudian dikering anginkan di ruangan yang tidak terkena langsung sinar matahari. Setelah kering maka akan tersisa endapan-endapan serbuk rimpang temu putih, endapan serbuk yang telah benar-benar kering kemudian dihaluskan dengan cara ditumbuk lalu disaring untuk memisahkan partikel halus dan kasar dengan menggunakan ayakan berpori kecil. Partikel kasar dihaluskan kembali sehingga terbentuk serbuk yang lebih halus.

Serbuk temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) yang telah disiapkan kemudian diencerkan dengan cara dilarutkan dengan akuades sehingga didapatkan beberapa dosis yang berbeda. Pembuatan ekstrak temu putih pada dosis 140 mg/kgBB/hari, 280 mg/kgBB/hari dan 700 mg/kgBB/hari dengan cara melarutkan masing-masing 3,78 mg dan 7,56 mg dan 18,9 mg serbuk temu putih ke dalam 0,3 ml aquades. Ekstrak tersebut untuk pemakaian satu kali *gavage* untuk satu ekor mencit sedangkan jika dibuat stok, ekstrak tersebut dapat dimasukkan ke dalam botol fial gelap dan ditutup dengan rapat. Larutan stok dapat disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C agar tidak terjadi perubahan kimiawi selama kurang lebih 4-5 hari.

4. Pemeriksaan siklus estrus mencit

Pemeriksaan siklus estrus pada mencit betina dilakukan dengan cara membuat preparat ulasan vagina. Mencit betina diambil kemudian ditangani dengan memegang bagian punggung hingga tengkuk mencit dengan jari telunjuk dan ibu jari, bagian ekor mencit dipegang dengan jari kelingking (Dye, 1993). Setelah itu, vagina mencit disemprotkan larutan NaCl 0,9% dengan menggunakan pipet yang tumpul, kemudian dihisap sampai 3 sampai 4 kali dengan hati-hati dan perlahan kemudian cairan pada pipet dari hasil penyemprotan/pengisapan diteteskan ke gelas objek 1-2 tetes. Biarkan hingga kering dan tetesi dengan larutan pewarna metilen blue 1 %. Biarkan 5 sampai 10 menit, bilas dengan akuades. Preparat yang telah ditutup dengan *cover glass* dilakukan pemeriksaan ulasan vagina mencit dengan menggunakan mikroskop (perbesaran 100×) dan dilihat fase proestrus dan estrus dalam struktur histologi sel epitel vagina. Fase proestrus ditandai dengan adanya sel-sel epitel biasa dan leukosit pada preparat histologi

sedangkan pada fase estrus ditandai dengan adanya sel kornifikasi atau sel epitel menanduk (Gulinello, 2008).

5. Pengawinan mencit

Dua puluh empat mencit betina dara yang sedang dalam masa estrus dikawinkan dengan mencit jantan dengan perbandingan 1 : 1 pada sore hari (Hogan, 1986). Keesokan harinya dilakukan pengecekan sumbat vagina (*vaginal plug*), mencit yang telah mengalami kopulasi ditandai dengan adanya sumbat vagina yang ditentukan sebagai hari ke-0 umur kebuntingan (Yadav dan Jain, 2010). Namun jika belum terdapat sumbat vagina, pengawinan dan pengamatan dilanjutkan setiap hari hingga terdapat sumbat vagina pada mencit.

6. Pemberian ekstrak temu putih

Pemberian ekstrak rimpang temu putih dilakukan secara oral dengan alat *gavage* terhadap tiap kelompok perlakuan sebanyak 0,3 ml/ekor/hari. Setiap mencit dalam kelompok perlakuan diberi ekstrak sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Perlakuan diberikan pada umur kebuntingan 0 sampai 15 hari. Selama masa perlakuan dalam pemberian ekstrak, mencit diberi pakan standar dan minum secara *ad libitum*. Berat badan mencit ditimbang selama perlakuan.

7. Penghitungan jumlah tapak implantasi (*implantation traces*)

Pada hari ke-18 umur kebuntingan, induk mencit ditimbang kemudian dibunuh dengan cara dislokasi leher. Pembedahan mencit dilakukan dengan membedah bagian abdomen atau secara laparotomi. Organ uterus mencit diangkat kemudian dikeluarkan fetus di dalamnya. Organ uterus dibersihkan dengan larutan NaCl 0,9% pada kaca arloji kemudian diserap kelebihan larutan NaCl dengan kertas hisap. Organ uterus lalu diberi beberapa tetes larutan *sodium hidroxide* (NaOH) 2% sebagai zat pewarna untuk memudahkan menghitung jumlah tapak implantasi yang ada (Yamada *et al.*, 1986).

8. Penghitungan jumlah fetus dan pengamatan keadaan fetus

Fetus dikeluarkan dari organ uterus dan dibersihkan dari plasenta selanjutnya dihitung dan diamati jumlah fetus serta keadaan fetus yang dihasilkan. Keadaan fetus yang dapat diamati yaitu fetus hidup serta kematian intrauterus, yakni fetus mati serta embrio yang mengalami resorpsi pada uterus. Fetus dalam keadaan hidup ataupun mati dapat dideteksi secara sederhana dengan menyentuh bagian tubuh fetus, apabila merespon dengan menggerakkan tubuhnya menandakan fetus dalam keadaan hidup, jika mati maka sebaliknya. Embrio yang mengalami resorpsi juga dihitung dan dicatat jumlahnya.

9. Penghitungan persentase keadaan fetus dan kematian intrauterus

Persentase keadaan fetus yang dihasilkan serta kematian intrauterus dapat diketahui dengan menghitung persentase fetus hidup, fetus mati, embrio yang diresorpsi serta abnormalitas atau malformasi eksternal fetus. Persentase tersebut dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Ibrahim, 2000).

1. Keberhasilan hidup embrio (jumlah fetus hidup):

$$= \frac{\text{Jumlah fetus hidup}}{\text{Jumlah implantasi}} \times 100\%$$

2. Fetus mati per induk:

$$= \frac{\text{Jumlah fetus mati}}{\text{Jumlah implantasi}} \times 100\%$$

3. Embrio diresorpsi per induk:

$$\frac{\text{Jumlah embrio diresorpsi}}{\text{Jumlah implantasi}} \times 100\%$$

4. Malformasi eksternal per induk:

$$\frac{\text{Jumlah fetus dengan malformasi eksternal}}{\text{Jumlah implantasi}} \times 100\%$$

10. Pengukuran berat badan fetus

Fetus yang dihasilkan dibersihkan dan dikeringkan, kemudian masing-masing fetus diukur berat badannya dengan menggunakan timbangan analitik. Berat badan diukur dalam satuan gram. Hasil pengukuran berat badan dicatat sebagai data berat badan fetus per ekor.

11. Pengukuran panjang badan fetus

Fetus yang dihasilkan disusun di atas kertas milimeter blok untuk dilakukan pengukuran panjang badan fetus dalam satuan milimeter. Posisi fetus pada bagian dorsal diluruskan sehingga pengukuran panjang lebih akurat. Panjang badan fetus kemudian diukur dari bagian ujung kepala hingga pangkal ekor fetus. Hasil pengukuran berat badan dicatat sebagai data panjang badan fetus per ekor.

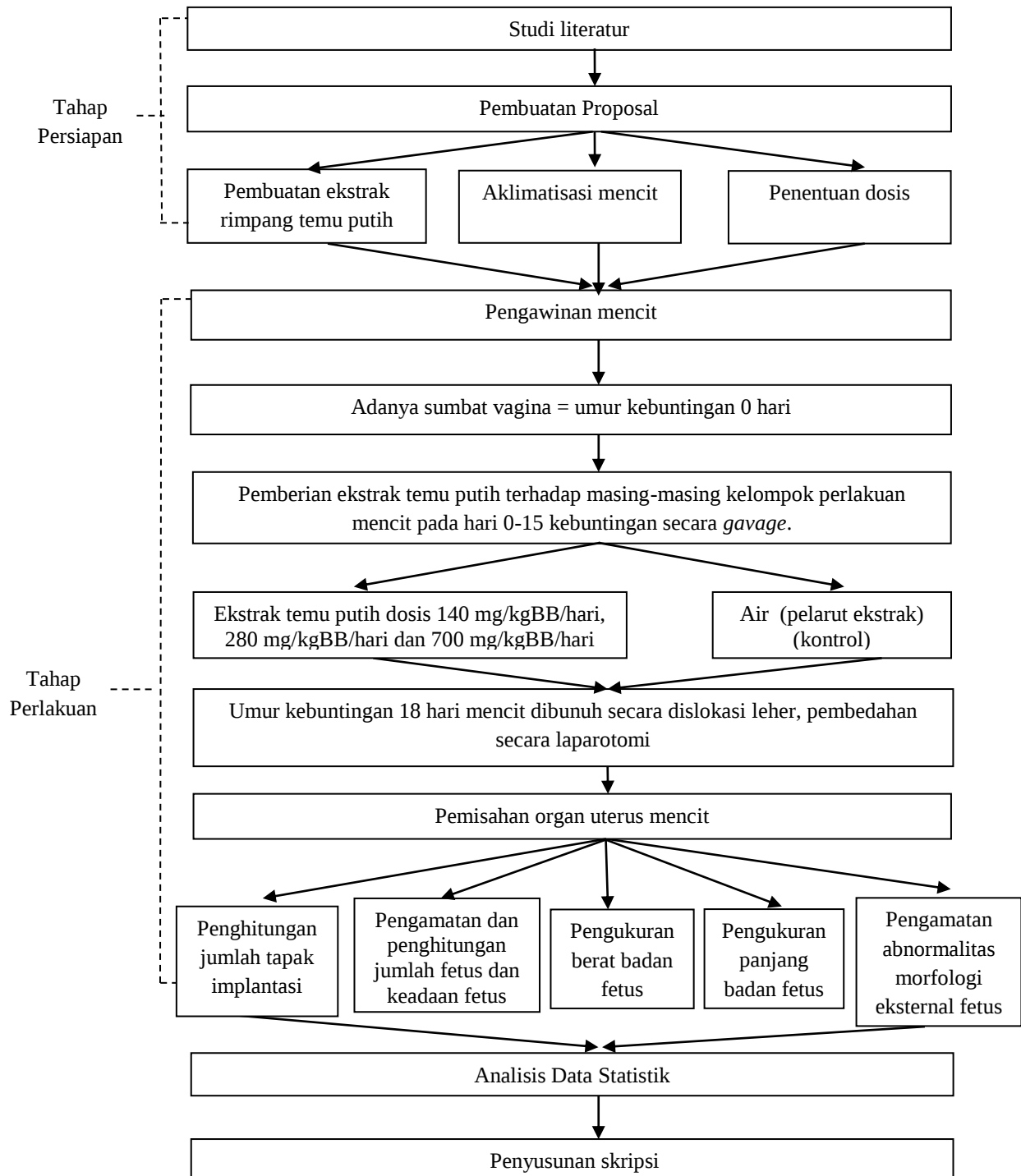
12. Pengamatan abnormalitas morfologi eksternal fetus

Morfologi eksternal fetus diamati secara seksama apakah terdapat kecacatan/abnormalitas pada bagian tubuhnya. Bagian organ yang diamati adalah kaki, tangan, kepala dan ekor. Kecacatan yang dapat terjadi di antaranya yaitu kaki, tangan serta ekor yang bengkok, anensefali, eksensefali serta hemoragi. Fetus yang mengalami kecacatan dihitung kemudian dicatat.

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dianalisa secara statistika dengan Data yang didapatkan diuji homogenitas dan normalitasnya. Uji normalitas menggunakan *Test of Normality (Kolmogorov-Smirnov)* dan uji homogenitas menggunakan *Test of Homogeneity of Variances (Levene Statistic)*. Data non parametrik yang didapatkan kemudian dianalisis dengan uji *Kruskall-Wallis* kemudian dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan uji *Mann-Whitney*.

H. Alur Penelitian



Gambar 3.1. Bagan alur penelitian