

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Dalam penelitian eksperimen terdapat kontrol sebagai acuan antara keadaan awal dengan sesudah diberi perlakuan, juga adanya replikasi dan randomisasi untuk meyakinkan hasil yang diperoleh (Nazir, 2003).

B. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL), dimana terdapat kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Kelompok perlakuan terdiri dari tiga kelas. Setiap kelas diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak jahe merah masing-masing 140 mg/kgBB/hari, 280 mg/kgBB/hari dan 700 mg/kgBB/hari. Kelompok kontrol negatif terdiri dari kelompok mencit yang hanya diberi akuades. Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) diperoleh dari Frederer, 1983 yaitu:

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan:

T = jumlah perlakuan

n = jumlah replikasi

15 = derajat bebas untuk RAL

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah pengulangan yang dilakukan untuk setiap perlakuan ialah $n \geq 6$. Mencit yang digunakan dibagi menjadi lima kelompok perlakuan pemberian ekstrak rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var.

Rubrum). Pengacakan dilakukan untuk menghilangkan bias (Sudjana, 2002). Denah

pengacakan
penempatan
kandang
pada Tabel

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

mencit dan
dalam
dapat dilihat
3.1

Tabel 3.1

Hasil

Randomisasi Mencit

Keterangan :

A : Kontrol

B : Diberi ekstrak *Z. officinale Rubrum* dengan dosis 140mg/kgBB/hari

C : Diberi ekstrak *Z. officinale Rubrum* dengan dosis 280mg/kgBB/hari

D : Diberi ekstrak *Z. officinale Rubrum* dengan dosis 700mg/kgBB/hari

1,2,3 dst: Nomor mencit

Berdasarkan hasil randomisasi mencit, maka didapatkan penempatan mencit pada kandangnya yang dapat dilihat pada Tabel 3.2

Tabel 3.2 Penempatan Mencit Berdasarkan Hasil Randomisasi

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

Sebelum diberi perlakuan, mencit diaklimatisasi selama 7 hari di kandang mencit. Selama aklimatisasi dan perlakuan, berat badan mencit ditimbang pada pagi

hari. Masing-masing perlakuan akan diulang sebanyak 6 kali. Pemberian ekstrak rimpang jahe dilakukan sebanyak 1 kali sehari pada pagi hari sejak ditemukan sumbat vagina yang disebut umur kebuntingan 0 hari. Setelah umur kebuntingan 3.5 hari mencit dibedah dan diambil bagian organ reproduksinya. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah embrio pada setiap tahapan dan jumlah embrio yang abnormal.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh mencit (*Mus musculus* L.) betina dara galur Swiss Webster sementara sampel penelitian ini adalah embrio praimplantasi mencit betina (*Mus musculus*) Swiss Webster berumur 8-12 minggu yang telah diberi ekstrak jahe merah secara gavage selama 3,5 hari umur kebuntingan.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Mei hingga September 2014. Pemeliharaan mencit dan gavage dilakukan di kandang hewan Kebun Botani UPI yang sudah terkondisikan. Pembuatan larutan, pembedahan dan pengamatan embrio praimplantasi dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

E. Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain jarum gavage, alat bedah, mikroskop, dan lain-lain, sementara bahan-bahan yang digunakan antara lain mencit betina dan jantan yang telah memasuki umur reproduksi, rimpang jahe merah, dan lain-lain. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini selengkapnya tercantum pada Lampiran 6.

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

Pada tahap ini terdapat tiga kegiatan yang harus dilakukan, yaitu tahap penentuan dosis, pembuatan ekstrak jahe merah, dan tahap persiapan mencit atau aklimasi. Berikut rangkaian yang harus dikerjakan pada masing-masing kegiatan:

a. Penentuan dosis

Penentuan dosis jahe merah dimodifikasi dari penelitian yang dilakukan Dissabandara (2007) yang menggunakan dosis 500 mg/kgBB dan 1000 mg/kgBB/hari untuk melihat pengaruhnya terhadap perkembangan fetus tikus Sprague Dawley. Selain itu, *European Medicines Agency* (2012) menyatakan bahwa pemberian ekstrak sejumlah 1500 mg/kgBB/hari pada tikus per oral tidak menyebabkan kematian dan efek toksik yang bermakna. Penentuan dosis juga didasarkan pada dosis pra-penelitian menggunakan dosis 1000 mg/kgBB/hari yang menyebabkan penurunan badan pada mencit uji sehingga dosis yang digunakan diturunkan. Berdasarkan penelitian tersebut maka dosis yang digunakan dimodifikasi yaitu 140 mg/kgBB, 280 mg/kgBB, dan 700 mg/kgBB/hari. Besar dosis yang diberikan pada mencit disesuaikan dengan berat badan mencit yang digunakan dan terlampir pada Lampiran 2.

b. Pembuatan ekstrak rimpang jahe merah

Rimpang jahe merah yang didapatkan dari Balai Penelitian Tanaman Obat (Balitro) diekstraksi dengan menggunakan air. Pembuatan ekstrak diawali dengan pencucian rimpang jahe merah menggunakan air hingga bersih. Rimpang diiris tipis menggunakan pisau kemudian dijemur di bawah sinar matahari hingga kering. Rimpang yang telah benar-benar kering kemudian digunting hingga menjadi potongan-potongan kecil lalu diblender hingga berbentuk serbuk. Serbuk tersebut disaring menggunakan saringan hingga didapatkan serbuk kasar yang siap diekstraksi.

Serbuk rimpang jahe merah dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1:16. Hasil campuran ini kemudian diperas dengan menggunakan kain. Serbuk yang tertinggal di kain kemudian dilarutkan kembali kedalam aquades dengan

perbandingan yang sama. Proses ini dilakukan sebanyak tiga kali. Air hasil perasan dikeringkan dengan cara didedahkan pada udara hingga mengering dan didapatkan endapan kering jahe merah berupa serbuk kasar. Serbuk ini selanjutnya ditumbuk hingga halus dan siap digunakan.

c. Pemeliharaan Mencit

Mencit jantan dan betina yang dipakai berumur 8-10 minggu dan memiliki bobot konstan 25-30 gr. Pemeliharaan mencit dilakukan di kandang mencit Kebun Botani UPI yang telah dikondisikan. Mencit dikelompokkan dalam kandang berukuran 40x30x12 cm berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan enam ekor setiap kandang. Selama aklimatisasi, mencit diberi pakan standar dan minum secara *ad libitum*. Botol minuman dibersihkan dan diganti airnya jika kotor atau diisi ulang apabila air telah habis. Selain itu sekam pada kandang mencit juga dibersihkan dua minggu sekali.

d. Pembuatan larutan dan hormon yang digunakan

Larutan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu NaCl 0.96% sebagai dan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) untuk *flushing* uterus. NaCl 0.96% merupakan larutan fisiologis yang digunakan untuk membersihkan uterus dari darah, sedangkan PBS digunakan untuk proses *flushing* uterus. NaCl dibuat dengan cara melarutkan 0.96 mg NaCl kedalam Aquades 100 ml. Larutan PBS dibuat dengan mencampurkan 55 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 45 mL KH_2PO_4 dan 400 mL aquades.

Hormon *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG) (1000 IU) dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) (75 IU) yang digunakan diencerkan dengan menambahkan NaCl 0.96%. Konsentrasi larutan stok hCG adalah 200 IU, sedangkan konsentrasi larutan stok FSH adalah 50 IU. Selanjutnya larutan stok disimpan didalam freezer dengan suhu -4°C . Hormon hCG dan FSH konsentrasi 5 IU dibuat ketika akan menyuntik mencit (Luo, 2011).

2. Tahap Perlakuan

a. Aklimatisasi mencit

Mencit diaklimatisasi selama tujuh hari di rumah mencit kebun botani FPMIPA UPI. Mencit dipelihara pada suhu ruangan 25-27⁰C dan kelembaban antara 76-92%. Proses aklimatisasi dilakukan agar mencit terbiasa dengan kondisi lingkungan selama dilakukan percobaan. Mencit dikelompokan dalam kandang berukuran 40 cm x 30 cm x 12 cm berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan 6 ekor tiap kandang. Selama aklimatisasi mencit diberi pakan standar dan minum secara *ad libitum*.

b. Pemberian hormon *human Chorionic Gonadotropin* (hCG) dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH)

Pemberian hormon ini bertujuan agar mencit betina yang digunakan mengalami ovulasi. Hormon FSH bertujuan untuk merangsang pertumbuhan folikel dan oogenesis. Hormon hCG bertujuan untuk proses ovulasi. Konsentrasi FSH dan hCG yang digunakan sebesar 5 IU. Hormon disuntikan secara intraperitoneal. Hormon yang digunakan pertama kali disuntikan pada mencit adalah hormon FSH. Setelah 48 jam kemudian mencit disuntik dengan hormon hCG (Luo, 2011).

c. Pengawinan Mencit

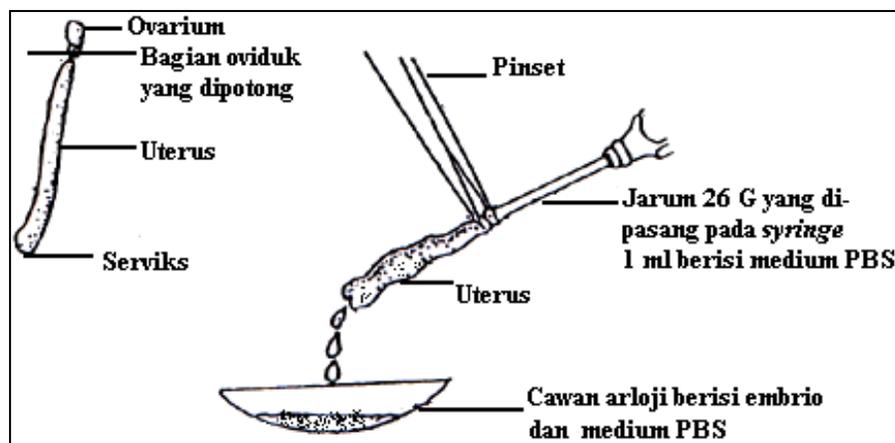
Pengawinan dilakukan dengan perbandingan mencit jantan dan betina 1:1. Mencit betina yang akan dikawinkan terlebih dahulu dipastikan sedang mengalami fase estrus. Mencit jantan dimasukkan ke kandang mencit betina pada pukul empat sore dan diperiksa esok paginya. Bila ditemukan sumbat vagina berarti mencit telah mengalami kopulasi dan berada pada hari kebuntingan ke nol. Mencit dengan sumbat vagina mulai diberi perlakuan dan yang belum kawin dicampurkan kembali dengan mencit jantan.

d. Pemberian Ekstrak Rimpang Jahe Merah

Pemberian ekstrak jahe merah dilakukan secara oral dengan menggunakan jarum *gavage*. Pengenceran ekstrak menggunakan aquades dapat dilakukan saat ekstrak akan digunakan. Ekstrak yang diberikan sebanyak 0.3 ml dengan konsentrasi 140 mg/kgBB/hari, 280 mg/kgBB/hari dan 700 mg/kgBB/hari. Pada kelompok kontrol dilakukan pemberian aquades sebanyak 0.3 ml. Pemberian ekstrak dilakukan pada pagi hari setelah ditemukannya sumbat vagina selama 3 hari semenjak hari kebuntingan ke nol.

e. Pengamatan embrio praimplantasi dan pengukuran diameter blastokista

Mencit yang telah diberi ekstrak jahe merah pada umur kebuntingan 3,5 hari didislokasi leher sebelum dilakukan pembedahan. Setelah pembedahan bagian organ reproduksi diisolasi. Bagian ovarium, oviduk dan uterus diletakkan pada cawan petri dan yang telah terisi larutan NaCl kemudian dibersihkan dari lemak dan darah yang menempel. Oviduk dibuang dan bagian ujung uterus dipotong agar embrio dapat keluar dari uterus. Embrio diambil dengan metode *flushing* menggunakan cairan PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7,2. *Flushing* menggunakan *syringe* 1 ml dengan jarum ukuran 26 G dan dilakukan di atas kaca arloji yang telah dibersihkan menggunakan alkohol, sehingga embrio hasil *flushing* tertampung di atas kaca arloji. *Flushing* dilakukan pada uterus kanan dan kiri agar embrio yang didapatkan maksimal. (Gambar 3.1) (Dye, 1993; Priyandoko, 2004).



Gambar 3.1 Koleksi embrio dengan cara *flushing*
(Sumber: Dye, 1993 dalam Priyandoko, 2004)

Kaca arloji yang berisi embrio dan medium PBS kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 4x dan 10x. Embrio praimplantasi yang ditemukan mulai dari pembelahan 1-2-4-8, fase morula, hingga fase blastokista dicatat jumlahnya dan diamati. Blastokista normal yang ditemukan dipindahkan ke dalam kaca arloji lain kemudian dihitung ukuran diameternya menggunakan skala yang dipasangkan pada lensa okuler. Ukuran diameter yang dihitung tidak termasuk zona pelucidanya. Pemandahan embrio tahap blastokista menggunakan pipet yang telah dihubungkan dengan selang dengan cara menyedot embrio blastokista dari ujung selang.

Pengamatan embrio abnormal dilihat melalui mikroskop dengan perbesaran 4x dan 10x. Embrio abnormal dapat terjadi mulai dari tahap pembelahan, morula, hingga blastula. Kriteria abnormalitas yang dilihat antara lain pada ada atau tidaknya zona pelucida, bentuk zona pelucida, degenerasi yang ditandai dengan sel blastomer yang pecah, fragmentasi, dan jumlah blastosol. Kriteria tersebut diambil berdasarkan abnormalitas yang sering terjadi pada embrio praimplantasi.

G. Analisis Data

Data yang telah diperoleh dianalisis secara statistika dengan program SPSS 16 *for windows*. Tahap awal yang dilakukan adalah uji prasyarat yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan uji homogenitas menggunakan *test of homogeneity of variance*. Data yang terdistribusi normal dan bervarian homogen dianalisis secara statistik parametrik yaitu analisis varian (*ANOVA*). Data yang tidak homogen dan tidak normal diuji secara statistik non parametrik yaitu dengan uji *Kruskall-Wallis*. Data yang tidak berbeda signifikan tidak diuji lebih lanjut dengan uji perbandingan berganda.

H. Alur Penelitian

