

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental (*experimental research*) yaitu penelitian yang berusaha mencari pengaruh variabel tertentu terhadap variabel lain dengan kontrol yang ketat dalam kondisi yang terkendalikan (Nazir, 2003).

B. Desain Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL), dimana terdapat tiga kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Kelompok perlakuan dalam penelitian ini terdiri dari 3 kelas. Masing-masing kelas diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak rimpang temu putih dengan dosis 140 mg/kgBB/hari, 280 mg/kgBB/hari dan 700 mg/kgBB/hari. Kelompok kontrol hanya diberi aquades setiap harinya. Banyaknya replikasi didapatkan dari rumus Frederer, (1983). Perhitungan replikasi yang dibutuhkan sebagai berikut :

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan:

T: Jumlah perlakuan

n: Jumlah replikasi

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, maka jumlah pengulangan untuk setiap perlakuan adalah $n \geq 6$. Mencit Swiss Webster yang digunakan dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan pemberian ekstrak rimpang temu putih. Pengacakan dilakukan untuk menghilangkan bias.

Tabel 3.1 Hasil pengocokan mencit Swiss Webster dan jenis perlakuan

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

Keterangan:

K: Kontrol

Z₁: Diberi ekstrak rimpang temu putih dengan dosis 140 mg/kgBB/hari

Z₂: Diberi ekstrak rimpang temu putih dengan dosis 280 mg/kgBB/hari

Z₃: Diberi ekstrak rimpang temu putih dengan dosis 700 mg/kgBB/hari

1,2,3 dst : Nomor mencit Swiss Webster

Berdasarkan Tabel hasil pengocokan mencit Swiss Webster dan jenis perlakuan maka diperoleh peta kandang yang dapat dilihat pada Tabel 3.2

Tabel 3.2 Peta kandang mencit Swiss Webster

Dosis	No. mencit Swiss Webster					
K	4	5	12	16	20	22
Z₁	1	6	8	9	19	21
Z₂	3	7	11	13	18	15
Z₃	2	10	14	17	23	24

Keterangan:

K: Kontrol

Z₁: Diberi ekstrak rimpang temu putih dengan dosis 140 mg/kgBB/hari

Z₂: Diberi ekstrak rimpang temu putih dengan dosis 280 mg/kgBB/hari

Z₃: Diberi ekstrak rimpang temu putih dengan dosis 700 mg/kgBB/hari

1,2,3 dst: Nomor mencit Swiss Webster

Sebelum diberi perlakuan, mencit Swiss Webster diaklimatisasi selama 7 hari di rumah hewan botani. Selama aklimatisasi, pemberian hormon dan selama perlakuan, berat badan mencit Swiss Webster ditimbang pada pagi hari. Masing-masing perlakuan akan diulang sebanyak 6 kali. Frekuensi pemberian ekstrak rimpang temu putih dilakukan sebanyak 1 kali sehari pada pagi hari sejak ditemukan sumbat vagina (*vagina plug*) (umur kebuntingan 0 hari). Setelah umur

kebuntingan 3.5 hari mencit Swiss Webster dibedah dan diambil bagian organ reproduksinya. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah embrio pada setiap tahapan, jumlah embrio abnormal dan diameter blastokista pada embrio praimplantasi mencit Swiss Webster.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh mencit Swiss Webster betina yang ada di rumah hewan jurusan Pendidikan Biologi di kebun botani UPI dan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Swiss Webster betina yang berusia 8 hingga 12 minggu dengan berat 26-30 gram yang diberi perlakuan dengan ekstrak rimpang temu putih.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga bulan Oktober 2014. Pembuatan ekstrak rimpang temu putih dan pengamatan embrio praimplantasi dilakukan di laboratorium Struktur Hewan FPMIPA UPI. Pemeliharaan dan perlakuan dilakukan di rumah hewan kebun botani FPMIPA UPI.

E. Alat Dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Struktur Hewan FPMIPA UPI dan rumah hewan botani FPMIPA UPI. Alat-alat dan bahan yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 6 dan Lampiran 7.

F. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian pada penelitian ini meliputi tahapan persiapan dan tahapan penelitian. Perinciannya adalah sebagai berikut:

1. Tahap Persiapan

a. Pemeliharaan mencit Swiss Webster

Mencit Swiss Webster betina yang didapatkan dari peternakan Institut Teknologi Bandung (ITB) dipelihara hingga berusia 8 minggu dan berat badan mencit Swiss Webster antara 25-30 gram. Mencit Swiss Webster dipelihara dalam wadah plastik berukuran 40 cm x 30 cm x 12 cm yang

bagian bawahnya telah diberi sekam. Mencit Swiss Webster yang dipelihara diberi pakan standar dan air minum secara *ad libitum*. Wadah dan tempat minum mencit Swiss Webster dibersihkan setiap minggu. Selain itu, sekam diganti setiap minggu agar wadah tetap bersih.

b. Pembuatan ekstrak rimpang temu putih

Metode ekstrak aqueous rimpang temu putih berdasarkan Halim *et al.* (2012). Rimpang temu putih yang didapatkan dari Balai Penelitian Rempah dan Tanaman Obat (Balitro) dicuci bersih dengan menggunakan air bersih. Kemudian rimpang diiris dengan pisau hingga tipis agar rimpang mudah kering. Selanjutnya, rimpang dijemur di bawah sinar matahari hingga benar-benar kering. Proses pengeringan ini berlangsung selama satu minggu. Setelah kering rimpang diblender hingga berbentuk serbuk. Serbuk kemudian disaring dengan menggunakan saringan sehingga serbuk yang didapatkan lebih halus.

Serbuk rimpang rimpang temu putih kemudian dilarutkan ke dalam aquades dengan perbandingan 1:16 (Halim *et al.*, 2012). Larutan ini kemudian disaring dengan menggunakan kain. Serbuk yang tertinggal di kain kemudian dilarutkan kembali ke dalam aquades dengan perbandingan yang sama seperti pada awal dilakukan. Proses ini dilakukan sebanyak tiga kali. Air yang didapatkan dari proses penyaringan kemudian dikering anginkan hingga hanya tersisa endapan. Endapan ini kemudian ditumbuk dengan menggunakan alu dan lumpang. Hasil serbuk ini kemudian disaring dengan menggunakan saringan biasa hingga didapatkan serbuk yang halus. Ekstrak yang belum halus kembali ditumbuk hingga semua ekstrak menjadi halus.

c. Pembuatan larutan dan hormon yang digunakan

Larutan yang digunakan dalam penelitian ini ada 2 macam, yaitu larutan NaCl 0.96% dan *Phosfat Buffer Saline* (PBS). Larutan NaCl 0.96% merupakan larutan fisiologis yang digunakan untuk membersihkan uterus dan tuba fallopi dari darah, sedangkan PBS digunakan untuk proses

flushing uterus dan tuba fallopi. Larutan NaCl 0.96% dibuat dengan cara melarutkan 0.96 mg NaCl ke dalam Aquades 100 ml. Larutan PBS dibuat dengan cara mencampurkan 55 mL Na₂HPO₄·2H₂O, 45 mL KH₂PO₄ dan 400 mL aquades.

Hormon HCG (1000 IU) dan FSH (75 IU) yang digunakan diencerkan dengan cara menambahkan larutan NaCl 0.96%. Konsentrasi larutan stok HCG adalah 200 IU, sedangkan konsentrasi larutan stok FSH adalah 50 IU. Selanjutnya larutan stok disimpan di dalam freezer. Hormon HCG dan FSH konsentrasi 5 IU dibuat ketika akan menyuntik mencit Swiss Webster (Luo *et al.*, 2011).

2. Tahap Penelitian

a. Aklimatisasi mencit Swiss Webster

Mencit Swiss Webster diaklimatisasi selama 1 minggu di rumah hewan kebun botani FPMIPA UPI. Mencit Swiss Webster dipelihara pada suhu ruangan 25-27⁰C dan kelembaban antara 76-92%. Proses aklimatisasi dilakukan agar mencit Swiss Webster terbiasa dengan kondisi lingkungan selama dilakukan percobaan. Mencit Swiss Webster berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan 6 ekor tiap kandang. Selama aklimatisasi mencit Swiss Webster diberi pakan standar dan minum secara *ad libitum*.

b. Penentuan dosis

Dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah 140 mg/kgBB/hari, 280 mg/kgBB/hari dan 700 mg/kgBB/hari. Besar dosis ini berdasarkan penelitian Yadav & Gain (2010) yang menyatakan *aqueous extract Curcuma longa* sebagai antifertilitas. Perlakuan dilakukan kepada tikus Winstar dengan dosis 100 mg/kgBB/hari, 200 mg/kgBB/hari dan 500 mg/kgBB/hari. Menurut Yadav (2010), pemberian ekstrak rimpang *Curcuma longa* menyebabkan perubahan biokimia pada uterus sehingga dapat digunakan sebagai antiimplantasi. Selain itu, pemberian ekstrak temu putih dengan dosis 250 mg/kgBB/hari dan 500 mg/kgBB/hari secara

in vitro dapat menghambat metastatis sel kanker (Seo *et al.*, 2005). Menurut Murwanti *et al.* (2006), pemberian ekstrak rimpang temu putih dengan dosis 250 mg/kgBB/hari hingga dosis 700 mg/kgBB/hari pada mencit Swiss Webster dapat menghambat pertumbuhan tumor paru-paru.

c. Pemberian Hormon FSH dan HCG

Pemberian hormon ini bertujuan agar mencit Swiss Webster betina yang digunakan mengalami ovulasi. Hormon FSH bertujuan untuk merangsang pertumbuhan folikel dan oogenesis. Hormon HCG bertujuan untuk proses ovulasi. Konsentrasi hormon FSH dan HCG yang digunakan sebesar 5 IU. Hormon disuntikan secara intraperitoneal pada bagian abdomen. Hormon yang digunakan pertama kali adalah hormon FSH. Setelah 47 hingga 49 jam, mencit Swiss Webster disuntik dengan hormon HCG (Luo *et al.*, 2011).

d. Pengawinan mencit Swiss Webster dan pemberian ekstrak rimpang temu putih

Mencit Swiss Webster yang telah diaklimatisasi dikawinkan dengan mencit Swiss Webster jantan pada sore hari. Perbandingan mencit Swiss Webster jantan dengan mencit Swiss Webster betina adalah 1:3. Proses pengawinan ini dilakukan secara bertahap agar ketika proses pembedahan dapat ditangani oleh satu orang. Setiap hari mencit yang dikawinkan sebanyak 6 ekor. Pada pagi hari vagina mencit Swiss Webster betina diperiksa untuk melihat sumbat vagina (*vagina plug*). Penentuan umur kebuntingan 0 hari adalah ketika ditemukan sumbat vagina (*vagina plug*). Pada mencit Swiss Webster yang tidak ditemukan sumbat vagina (*vagina plug*) kembali dikawinkan dengan mencit Swiss Webster jantan, sedangkan mencit Swiss Webster betina yang memiliki sumbat vagina (*vagina plug*) diberi perlakuan dengan ekstrak rimpang temu putih. Pemberian ekstrak rimpang temu putih dilakukan secara *gavage*.

e. Pengamatan dan penghitungan jumlah embrio praimplantasi

Mencit Swiss Webster betina dengan umur kebuntingan 3 hari dibedah, kemudian bagian uterus dan tuba fallopi diisolasi. Uterus dan tuba fallopi yang telah diambil ditempatkan di dalam cawan Petri kemudian dibersihkan dari lemak dan darah yang menempel dengan menggunakan larutan NaCl 0.96%. Selanjutnya, uterus diangkat dengan menggunakan pinset kemudian *diflushing* dengan larutan PBS menggunakan *syringe* ukuran 1 ml. Bagian kiri dan kanan uterus harus dipastikan *ter-flushing* agar embrio yang ada di dalam dapat keluar semuanya. Larutan PBS diperiksa dengan menggunakan mikroskop, kemudian embrio yang ditemukan dihitung dan diamati.

f. Pengamatan abnormalitas embrio praimplantasi dan pengukuran diameter embrio

Morfologi embrio yang ditemukan dilihat, dengan menggunakan mikroskop. Morfologi embrio yang diamati meliputi ada atau tidaknya zona pelusida, keadaan sel dan bentuk dari embrio. Selanjutnya, embrio yang ditemukan dihitung ukurannya dengan menggunakan mikroskop yang telah diberi alat untuk menghitung diameter sel pada bagian lensa okulernya. Tahapan embrio yang dihitung ukurannya adalah embrio yang berada pada tahap blastokista.

G. Analisis Data

Data yang telah diperoleh diuji dengan menggunakan SPSS 16 *for windows*. Tahapan pertama yang dilakukan uji normalitas menggunakan uji *test of normality (Kolmogorov-smirnov)* dan uji homogenitas menggunakan *test of homogeneity of variance Levene*. Data yang terdistribusi normal dan homogen dianalisis secara parametrik yaitu analisis varian (ANOVA). Data yang tidak homogen dan tidak normal yang diuji dengan menggunakan *Kruskal-Wallis*. Data yang berbeda signifikan kemudian diuji lebih lanjut dengan uji *Duncan* pada data yang diuji parametrik, sedangkan data nonparametrik diuji dengan menggunakan *Mann-Whitney*.

H. Alur Penelitian

