

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan. Pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di rumah hewan percobaan di Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. Pembuatan fraksi n-butanol buah lerak (*Sapindus rarak*) dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. Pembuatan sediaan apusan vagina dilakukan di rumah hewan coba Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. Pembuatan sayatan histologis vagina dan serviks dilakukan di Laboratorium Histologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah lerak (*Sapindus rarak*) yang diperoleh langsung dari pasar tradisional Larangan, kota Sidoarjo, propinsi Jawa Timur. Bahan untuk ekstraksi yaitu metanol 90%, dietil eter, n-butanol, akuades, HCl 2 N, dan HCl 1 N.

Bahan untuk pembuatan apusan vagina yaitu alkohol 70%, *methylen blue* 0,1%, NaCl 0,9%, dan akuades. Bahan untuk pembuatan preparat histologis yaitu bahan fiksasi buffer formalin 10%, akuades, etanol bertingkat yaitu 70, 80, dan 96%, xylol, parafin, pewarna *Hematoxylin-Eosin*, albumin, dan entellan.

Hewan coba yang digunakan adalah mencit. Mencit yang digunakan adalah betina dewasa belum pernah kawin, berumur 6 – 8 minggu, strain BALB/C, berat badan berkisar 25 – 35 gram sebanyak 48 ekor. yang diperoleh dari bagian pemeliharaan hewan percobaan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

3.2.2 Peralatan penelitian

Alat yang digunakan selama penelitian ini adalah timbangan elektrik digital (OHAUS Adventure) dengan ketelitian hingga dua angka di belakang koma, *rotary vacuum evaporator*, *paraffin bath*, *rotary microtome* (Microm HM 315), mikroskop cahaya (OLYMPUS CX-21), *hand counter*, *waterbath* (JULABO TW8), *paraffin oven* (Sakura), *spectrophotometer UV-Visible*.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan dalam penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi 2 kelompok besar yaitu kelompok yang diinjeksi hormon estrogenik dan yang tidak diinjeksi hormon estrogenik. Masing-masing kelompok dibagi lagi menjadi 4 kelompok dengan beda lama waktu (P0, P1, P2, dan P3) dan diulang sebanyak 6 kali.

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus Federer (Federer, 1967):

$$(r-1)(n-1) = 15$$

Keterangan:

r = jumlah kelompok

n = jumlah replikasi atau pengulangan tiap kelompok

Terdapat 4 kelompok dalam penelitian ini (t = 4)

$$(r-1)(n-1) = 15$$

$$(4-1)(n-1) = 15$$

$$(n-1) = 5$$

$$n = 6$$

3.4 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah:

1. Variabel bebas (*independent variable*): lama waktu (jam) fraksi n-butanol buah lerak (*Sapindus rarak*) dalam saluran reproduksi betina dan siklus reproduksi.
2. Variabel terikat (*dependent variable*): jumlah sel epitel vagina (sel/lapang pandang) dan diameter lumen vagina dan serviks (mm).
3. Variabel terkontrol: umur, strain mencit, berat badan, suhu kandang, pakan dan minum yang diberikan selama pemeliharaan.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Pembuatan serbuk buah lerak

Buah lerak (*Sapindus rarak*) sebanyak 2 kg dibersihkan dan dikupas untuk diambil daging buahnya. Daging buah tersebut kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven (60°C) sampai diperoleh berat yang konstan kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender sehingga diperoleh serbuk kering kulit buah lerak (Jaya, 2010).

3.5.2 Uji Liebermann-Burchard

Uji Liebermann-Burchard menguji adanya saponin steroid dan triterpenoid dalam buah lerak. Serbuk kering kulit buah lerak sebanyak 5 – 20 gram direaksikan dengan etanol mendidih, disaring ekstraknya hingga kering. Residu dibuihkan dengan Liebermann-Burchard. Jika uji ini positif, eter yang tidak larut dalam air dihidrolisis dengan HCl 2N encer, pembentukan endapan menandakan adanya saponin. Ekstrak diuapkan dan sejumlah kecil residu yang diuji ditempatkan pada tabung reaksi, ditetesi asam asetat anhidrat, diaduk dengan spatula. Ditambahkan beberapa tetes asam sulfat, jika larutan berwarna biru hijau menandakan larutan tersebut merupakan saponin triterpenoid, jika larutan berwarna merah ungu menandakan larutan tersebut saponin steroid (Anshori, 2007).

Untuk menentukan kadar saponin triterpenoid yang terkandung di dalam ekstrak metanol dan fraksi n-butanol buah lerak dilakukan uji dengan menggunakan spektrofotometer UV-Visible. Pembuatan larutan standar saponin menggunakan standard Saponin Merck dengan konsentrasi 2,5; 5,0; 7,5; 10 ppm, kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 365 nm, sehingga diperoleh kurva standar saponin. Perhitungan kadar saponin hasil ekstraksi dan fraksi n-butanol dihitung kadarnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis berdasarkan kurva standar saponin Merck (Fathonah, 2008).

3.5.3 Pembuatan fraksi n-butanol buah lerak

Berdasarkan penelitian Jaya (2010), pembuatan fraksinasi n-butanol buah lerak (*Sapindus rarak*) diawali dengan metode maserasi dengan pelarut metanol 90% sebanyak 300 mL. ke dalam Erlenmeyer dimasukkan 25 gram sampel, dikocok tiap 2 jam sekali selama 24 jam, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum*. Disuspensi dengan akuades 35 mL, kemudian ditambahkan dietil eter 1:1, dikocok dan dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan (lapisan air dan lapisan dietil eter), lapisan air diambil dan diekstraksi dengan n-butanol 1:1. Lapisan n-butanol diambil dan dikeringkan menggunakan *freeze dryer* suhu -45°C dan tekanan 5mTorr kemudian ditimbang.

3.5.4 Penentuan konsentrasi fraksi n-butanol buah lerak

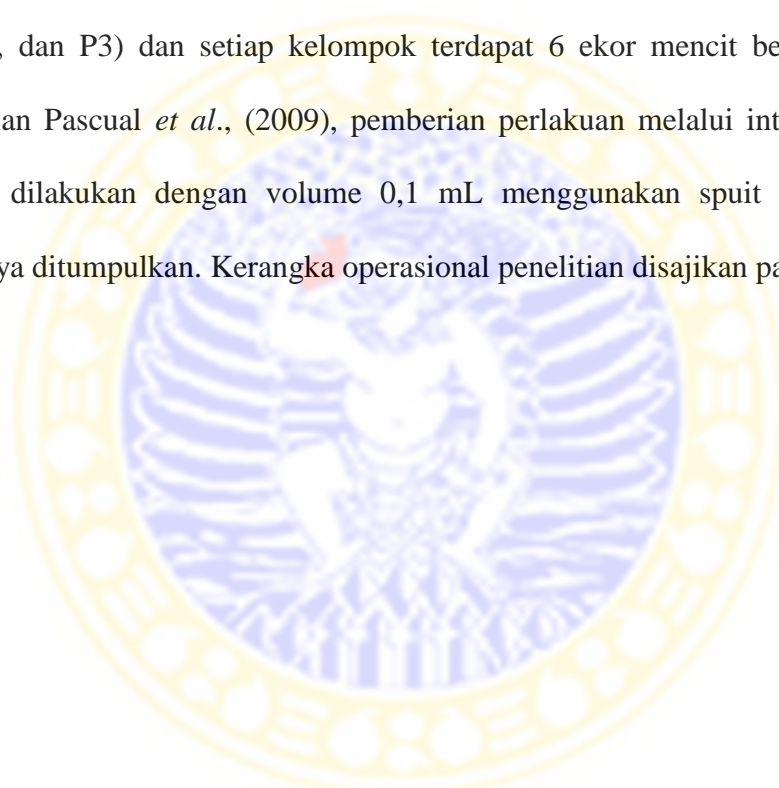
Berdasarkan penelitian Shah *et al.*, (2008), konsentrasi fraksi n-butanol buah lerak yang berpengaruh terhadap infertilitas mencit adalah 300 dan 500 $\mu\text{g/mL}$. Dosis yang optimal untuk membunuh spermatozoa mencit yaitu 600 $\mu\text{g/mL}$ (Herawati, (2012); Purnamasari, (2012)). Sehingga dalam penelitian ini menggunakan dosis 600 $\mu\text{g/mL}$.

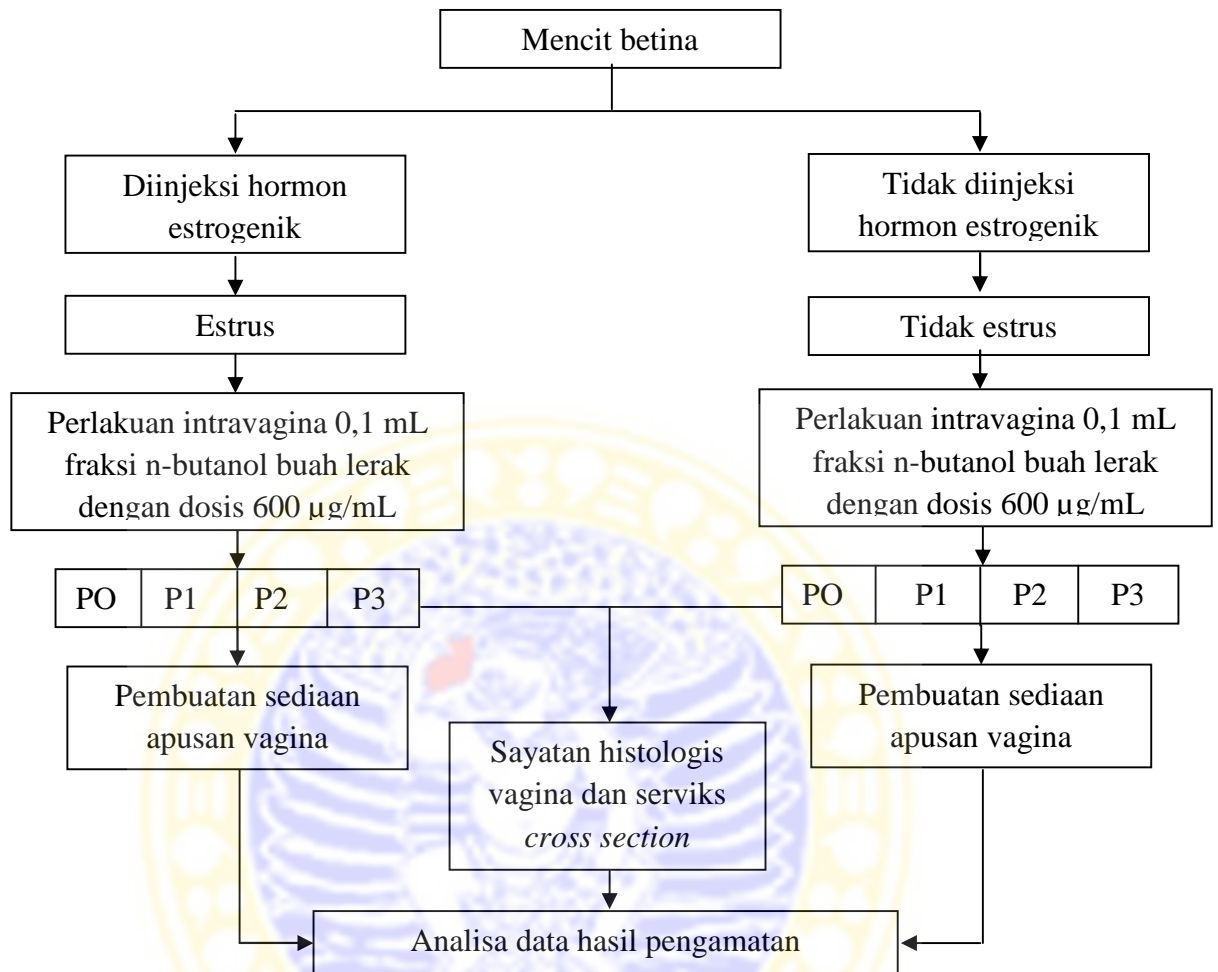
3.5.5 Persiapan hewan coba

Mencit yang digunakan merupakan hewan sehat dengan ciri-ciri: memiliki rambut yang halus dan tidak kusam ataupun tidak berdiri, gerakannya lincah, seluruh bagian tubuhnya dalam keadaan baik, tidak cacat, dan tidak ada luka. Hewan tersebut diaklimatisasi selama 14 hari. Setiap 6 ekor mencit ditempatkan dalam sebuah bak plastik beralaskan sekam dilengkapi dengan penutup dari kawat kasa dan botol minum yang berisi air bersih dari PDAM. Makanan dan minuman diberikan secara *ad-libitum*.

3.5.6 Pengelompokan dan perlakuan hewan coba

Sebanyak 48 ekor mencit betina dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok yang diberi hormon estrogenik (ovalumon) yang bertujuan untuk membuat kondisi estrus (A) dan yang tidak diberi hormon estrogenik (ovalumon) yang bertujuan membuat kondisi tidak estrus (B), masing-masing kelompok 24 ekor. Setiap kelompok (A dan B) dibagi lagi menjadi 4 kelompok perlakuan (PO, P1, P2, dan P3) dan setiap kelompok terdapat 6 ekor mencit betina. Menurut penelitian Pascual *et al.*, (2009), pemberian perlakuan melalui intravagina pada mencit dilakukan dengan volume 0,1 mL menggunakan spuit 1,0 mL yang ujungnya ditumpulkan. Kerangka operasional penelitian disajikan pada gambar.





Gambar 3.1. Kerangka operasional penelitian

Keterangan:

- P0 : Kontrol (tanpa pemberian fraksi n-butanol buah lerak) dengan penambahan salin sebanyak 0,1 mL
 P1 : Pengamatan 2 jam setelah pemberian fraksi n-butanol buah lerak sebanyak 0,1 mL dengan dosis 600 µg/mL
 P2 : Pengamatan 4 jam setelah pemberian fraksi n-butanol buah lerak sebanyak 0,1 mL dengan dosis 600 µg/mL
 P3 : Pengamatan 6 jam setelah pemberian fraksi n-butanol buah lerak sebanyak 0,1 mL dengan dosis 600 µg/mL

3.5.7 Pembuatan preparat apusan vagina

Mencit diambil sekret vagina dengan menggunakan *cotton buds* yang telah dibasahi dengan larutan NaCl 0,9%, secara perlahan dimasukkan ke dalam vagina lalu diputar searah sebanyak dua hingga tiga kali. Ujung *cotton buds* dioleskan pada permukaan objek gelas sebanyak dua hingga tiga kali. Lalu difiksasi dengan metanol. Apusan vagina pada objek gelas ditetesi dengan pewarna *methylene blue* 1%, diratakan dengan cara digoyang-goyangkan lalu didiamkan selama 5 menit. Preparat apusan vagina dicuci dengan akuades. Kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x (Goldman *et al.*, 2007). Kemudian dihitung jumlah epitel yang bertanduk dan tidak bertanduk dengan menjumlahkan kedua sel tersebut dalam lapang pandang lalu dibuat prosentase antara kedua sel tersebut.

3.5.8 Pembuatan sediaan sayatan histologis vagina dan serviks

Mencit dilakukan pembedahan pada kulit abdomen, organ vagina dan serviks diambil dan jaringan ikat disekitarnya juga dipotong, kemudian difiksasi minimal 48 jam dengan buffer formalin 10%. Kemudian diambil dan dimasukkan ke dalam kaset sebagai tempat penampung organ, lalu dicuci dengan cara dibilas di bawah air mengalir dengan tekanan rendah selama 15 – 20 jam. Organ vagina dan serviks secara berturut-turut dimasukkan ke dalam larutan etanol 70%, selama 4x30 menit, etanol 80% selama 2x30 menit, etanol 96% selama 30 menit dan terakhir etanol absolut selama 30 menit. Dilanjutkan dengan proses *clearing* yaitu penggantian agen dehidrasi dengan xylol dan merupakan medium antara proses

dehidrasi dan *embedding*. Organ vagina dan serviks kemudian secara berturut-turut dimasukkan ke dalam larutan xylol I selama 15 menit dan xylol II selama overnight. Organ vagina dan serviks selanjutnya secara berturut-turut dimasukkan dalam larutan xylol : parafin = 1 : 1 selama 30 menit, parafin murni I, parafin II, dan parafin III masing-masing selama 60 menit. Proses ini dilakukan untuk menghilangkan xylol dari jaringan atau organ dan menggantikannya dengan parafin sehingga terbentuk blok-blok parafin. Spesimen diletakkan sedemikian rupa untuk mendapatkan potongan *cross section*, selanjutnya dibiarkan dingin dan mengeras. Spesimen dalam blok parafin dipotong dengan ketebalan 5 μ m menggunakan mikrotom hingga membentuk pita. Pemotongan blok paraffin dilakukan secara seri. Pita yang terbentuk disusun pada objek gelas yang sebelumnya telah diolesi albumin, dengan menggunakan *waterbath*. Spesimen dimasukkan ke dalam oven bersuhu 40°C – 50°C selama 12 – 15 jam. Setelah dioven, preparat vagina dan serviks dimasukkan berturut-turut ke dalam larutan xylol I selama 15 menit, lalu xylol II selama 15 menit, etanol absolut, etanol 96%, etanol 80%, dan etanol 70% masing-masing selama 5 menit, larutan pewarna *Harris's hematoxylin* selama 2 – 3 menit, lalu dialirkan di bawah air mengalir selama 5 menit, kemudian dimasukkan ke dalam larutan etanol asam (etanol 70% ditambahkan beberapa tetes HCl) selama 5 menit, direndam dalam akuades selama 1 menit, larutan eosin, akuades selama 5 menit, selanjutnya dimasukkan ke dalam etanol 70%, etanol 80%, etanol 96%, dan etanol absolut masing-masing 5 menit dan terakhir dimasukkan xylol I selama 10 menit, dan xylol II selama 10

menit, *cover glass* ditetesi entelan dan ditutupkan pada gelas obyek (Sudiana, 2005).

3.6 Pengambilan Data

Penelitian ini terdiri atas 2 kelompok besar yang masing-masing kelompok dibedakan lagi menjadi 4 kelompok beda berdasarkan lama waktu pemberian fraksi n-butanol buah lerak, masing-masing kelompok beda terdiri atas 6 ekor mencit. Data jumlah epitel diambil dengan cara menghitung jumlah epitel 10 lapang pandang mikroskop pada masing-masing mencit. Setelah itu data dirata-rata.

Data diameter lumen vagina dan serviks diambil dengan cara mengukur diameter lumen dengan micrometer yang telah ditera (1 okuler = 12,75 μm). Setelah itu data diameter lumen vagina dan serviks masing-masing dirata-rata.

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari perhitungan jumlah epitel vagina dan diameter lumen vagina dan serviks diuji menggunakan uji normalitas lalu uji homogenitasnya setelah itu diuji menggunakan ANOVA. Jika hasil analisis tersebut bermakna ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji BNT untuk mengetahui beda antar tiap kelompok perlakuan.