

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan Oktober 2009 di Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung, pembuatan ekstrak rumput teki (*Cyperus rotundus* L.) di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung dan pembuatan preparat histologi sel-sel granulosa dilakukan di Laboratorium Patologi Balai Penyidikan dan Pengujian Hewan Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : kandang mencit yang terbuat dari kawat sebanyak 6 kandang, masing-masing kandang berisi 4 ekor mencit dengan 4 perlakuan yang berbeda, spuit 1 ml yang telah ditumpulkan bagian ujungnya digunakan untuk pencekok ekstrak rimpang rumput teki, lemari pengering, ayakan *mesh*, oven, timbangan, *rotary evaporator* untuk memekatkan ekstrak rimpang rumput teki, pipa karet kecil

untuk pencekohan ekstrak rimpang rumput dan seperangkat alat bedah untuk membedah mencit serta mengambil organ reproduksinya.

Alat-alat yang digunakan untuk proses pembuatan preparat histologi granulosa, antara lain : pinset skapel, *embedding cassette*, oven, cangkir logam, cetakan *paraffin*, balok kayu, kuas, *flotation bath*, inkubator, *stopwatch*, api gas, pisau, pisau mikrotom, mikrotom geser, *tissue prosesor*, *obyek glass*, *cover glass*, kertas label untuk memberi tanda preparat histologi granulosa, mikroskop untuk pengamatan preparat histologi dan kamera untuk dokumentasi.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu : 24 ekor mencit betina berumur 3 bulan dengan berat 30-40 gram, ekstrak rimpang rumput teki, aquabides digunakan untuk pengenceran ekstrak rimpang rumput teki, pelet ayam sebagai pakan mencit, *kloroform* sebagai obat bius, *buffer formalin* 10% sebagai larutan fiksasi, alkohol 80% dan 90% untuk dehidrasi, alkohol absolut dan *Xylo* untuk *clearing*, *paraffin* untuk *impregnasi*, *paraplast* (*paraffin cair*) untuk meletakkan organ, *canada balsam* untuk melekatkan *slide* preparat dengan *cover glass* dan seperangkat zat pewarna HE (*Hematoxylin-Eosin*).

C. Metode Kerja

1. Persiapan Kandang

Sebelum penelitian dilaksanakan, terlebih dahulu disiapkan kandang dari kawat dengan ukuran 15 x 15 cm.

2. Penyediaan Bahan Uji

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit betina (*M. Musculus L.*) yang berumur 3 bulan dengan berat badan 30-40 gram sebanyak 24 ekor dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan masing-masing dengan 6 kali pengulangan. Hewan percobaan diperoleh dari Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) regional III, Bandar Lampung. Sebelum diberi perlakuan semua hewan percobaan diaklimatisasi selama satu minggu yang bertujuan untuk penyesuaian mencit terhadap lingkungan dan perlakuan yang baru dan membatasi pengaruh lingkungan dalam penelitian. Setiap hari mencit diberi pakan berupa pelet dan air minum secara *ad libitum* (pemberian makan secara terus menerus selama 24 jam sampai kenyang). Rimpang rumput teki (*C. rotundus L.*) diperoleh dari Kelurahan Labuhan Dalam, Kecamatan Tanjung Senang Bandar Lampung.

3. Pembuatan Ekstrak Rumput Teki (*C. rotundus* L)

Terlebih dahulu tumbuhan diidentifikasi untuk memastikan rimpang yang diambil berasal dari tumbuhan rumput teki (*C. rotundus* L.). Rimpang yang diperoleh dibersihkan, kemudian dikeringkan sebanyak 500 gram.

Pengeringan selanjutnya dengan lemari pengering pada suhu tidak lebih dari 50 °C hingga menjadi serbuk. Kemudian serbuk rimpang rumput teki dihaluskan dengan ayakan mesh-48 hingga menjadi halus. Kemudian serbuk yang telah halus dibuat ekstrak rimpang rumput teki dengan cara dimaserasi (perendaman dengan pelarut ethanol 99% sebanyak 1,5 liter selama 1hari) di dalam toples. Setelah itu hasil maserasi dipisahkan dari ampasnya untuk disaring dari pelarut hingga ekstrak menjadi pekat dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C dengan kecepatan 60 rpm kurang lebih selama 2 jam. Setelah pemekatan tersebut maka diperoleh ekstrak rimpang rumput teki (*C. rotundus* L) dalam bentuk pasta yang kemudian diencerkan menjadi bentuk cair.

4. Pemberian Perlakuan Ekstrak Rumput Teki (*C. rotundus* L.)

Menurut Sa'roni dan Wahjoedi (2002) tentang "Pengaruh Infus Rimpang *Cyperus rotundus* L. Terhadap Siklus Estrus Dan Bobot Uterus Pada Tikus Putih", perlakuan yang diberikan yaitu:

1. Kelompok kontrol dengan 1 ml/100 g BB (A)
2. Kelompok dosis 11,25 mg/100 g BB (B)

3. Kelompok dosis 112,5 mg/100 g BB (C)
4. Kelompok dosis 337,5 mg/100 g BB(D)

Dosis tersebut didapat dari serbuk rimpang rumput teki 11,25 mg dan diberikan pada hewan uji tikus putih dengan berat 100 gram (2,5 X berat mencit), kemudian dikonversi ke berat mencit yang dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok, sehingga dosis ekstrak rimpang rumput teki yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Kelompok (K) Perlakuan kontrol dengan diberi 96 ml aquabides

Kelompok (P1) Perlakuan dosis 1, 256 ml/40g BB

Kelompok (P2) Perlakuan dosis 12, 56 ml/40g BB

Kelompok (P3) Perlakuan dosis 37, 67 ml/40g BB

Masing-masing kelompok perlakuan diberi ekstrak rumput teki dengan cara dicekok (secara oral) menggunakan spuit yang ujungnya ditumpulkan dan diberi pipa karet kecil. Pencekokan dilakukan satu kali sehari pada pukul 10.00 WIB selama 14 hari, untuk mengetahui pengaruh penyerapan tubuh mencit terhadap ekstrak rumput teki. Pada hari ke 15, dilakukan proses pembedahan untuk diambil ovariumnya.

5. Proses Pembedahan Mencit (*Mus musculus L.*)

Proses pembedahan mencit dilakukan pada hari ke-15 untuk diambil ovariumnya, setelah diberi perlakuan selama 14 hari. Mencit yang akan dibedah, sebelumnya terlebih dahulu dibius dengan *kloroform*, kemudian setelah mencit tidak bergerak lagi lalu mulai dilakukan pembedahan pada bagian ventral tubuh mencit secara vertikal. Spesimen dibuka perutnya dan diambil ovariumnya. Ovarium yang telah diambil segera difiksasi dengan larutan *formalin* 10% atau 10% *formolsaline* (1 bagian *formalin* dalam 9 bagian NaCl – fisiologis) di dalam botol. Perbandingan volume spesimen dengan larutan *formalin* 1 : 10, agar didapatkan hasil fiksasi yang sempurna. Kemudian ovarium tersebut segera dibawa ke Laboratorium Patologi Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung untuk dibuat preparat histologinya, sehingga lapisan granulosa dapat diamati.

D. Pengamatan dan Pengukuran Ketebalan Lapisan Granulosa

1. Teknik Pembuatan Slide

Ketebalan lapisan granulosa dievaluasi melalui gambaran histologi dari ovarium.

Prosedur pembuatan preparat histologi yang dilakukan terhadap jaringan ovarium adalah sebagai berikut (Tim Patologi, 2007) :

a. Trimming

Trimming dilakukan setelah proses fiksasi dengan menggunakan larutan *buffer formalin* 10%, dengan perbandingan antara volume spesimen dengan larutan 1 : 10 untuk mendapatkan hasil yang baik. Spesimen berupa ovarium dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan larutan fiksasi, kemudian jaringan spesimen dipotong setebal 2 – 4 mm menggunakan pisau skapel No. 22-24. Potongan jaringan tersebut dimasukkan ke dalam *embedding cassette*, tiap *embedding cassette* berisi 1–5 buah potongan jaringan yang disesuaikan dengan besar kecilnya potongan. Kemudian dicuci di bawah air mengalir selama 30 menit.

b. Dehidrasi

Embedding cassette diletakkan di atas tisu untuk mengeringkan air.

Kemudian diberi perlakuan sebagai berikut secara berurutan :

Tahap	Waktu	Zat Kimia
Dehidration	2 jam	Alkohol 80%
	2 jam	Alkohol 95%
	2 jam	Alkohol 95%
Clearing	1 jam	Alkohol absolut I
	1 jam	Alkohol absolut II
	1 jam	Alkohol absolut III

	1 jam	Xylol I
	1 jam	Xylol II
	1 jam	Xylol III
Impregnasi	2 jam	Paraffin I
	2 jam	Paraffin II
	2 jam	Paraffin III

c. Embedding

Setelah proses dehidrasi, disiapkan *paraplast* cair dengan *paraplast* dimasukkan ke dalam cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu di atas 58⁰C. Dituangkan *paraplast* cair ke dalam *pans*. Jaringan satu persatu dipindahkan dari *embedding cassette* ke dasar *pans* dengan mengatur jarak satu dengan yang lainnya. *Pans* dimasukkan atau diapungkan di dalam air. *Paraplast* yang berisi jaringan dilepaskan dari *pans*, *paraplast* dipotong-potong sesuai dengan letak jaringan dengan menggunakan *skalpet* atau pisau hangat. Kemudian diletakkan pada balok kayu yang berfungsi untuk dipegang saat dipotong dengan mikrotom, pinggirnya diratakan dan ujungnya dibuat sedikit meruncing. Blok *paraplast* siap dipotong dengan menggunakan mikrotom.

d. Cutting

Proses cutting dilakukan di dalam ruangan dingin. *Cutting* adalah proses pemotongan jaringan dengan menggunakan mikrotom yang terlebih dahulu didehidrasi. Sebelum dipotong, blok terlebih dahulu didinginkan, pemotongan dilakukan secara kasar dan halus, selanjutnya blok dipotong dengan ketebalan 4 -5 μm . Setelah blok dipotong, dipilih lembaran yang baik, diapungkan pada air dan kerutannya dihilangkan dengan cara salah satu sisi lembaran jaringan tersebut ditekan dengan ujung jarum, di sisi lain ditarik dengan kuas runcing. Kemudian lembaran jaringan tersebut dipindahkan ke dalam *waterbath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna. Dengan gerakan disedot, jaringan tersebut diambil dengan *slide* bersih dan ditempelkan di tengah atau sepertiga atas/bawah. Dihindari agar jangan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan. Setelah itu *slide* yang telah berisi jaringan ditempatkan pada inkubator (37°C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna pada *slide*.

e. Staining (pewarnaan) Menggunakan Pewarna HE (*Hematoxylin-Eosin*)

Setelah pembuatan *slide* preparat selesai, dilakukan pengamatan di bawah mikroskop untuk melihat preparat yang terbaik sebelum dilakukan pewarnaan. Proses selanjutnya adalah pewarnaan dengan menggunakan

pewarna HE, secara berurutan *slide* dimasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut :

Zat Kimia	Waktu
Xylol I	5 menit
Xylol II	5 menit
Xylol III	5 menit
Alkohol Absolut I	5 menit
Alkohol Absolut II	5 menit
Aquades	1 menit
<i>Harris Hematoxylin</i>	20 menit
Aquades	1 menit
Acid alkohol	2 – 3 celupan
Aquades	1 menit
Aquades	15 menit
<i>Eosin</i>	2 menit
Alkohol 96% I	2 menit
Alkohol 96% II	3 menit
Alkohol Absolut III	3 menit
Alkohol Absolut IV	3 menit
Xylol IV	5 menit
Xylol V	5 menit

f. Mounting

Setelah proses pewarnaan selesai *slide* ditempatkan di atas tisu pada tempat yang datar, bagian atas *slide* ditetesi dengan bahan *mounting* yaitu *canada balsam* dan langsung ditutup dengan *cover glass* dengan cepat agar tidak ada gelembung udara yang terbentuk.

g. Pembacaan Slide Dengan Mikroskop

Slide yang telah jadi diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40x, 100x, 200x atau 400x. Pada *slide* yang baik, akan terlihat inti sel berwarna biru dan sitoplasma berwarna merah. Hasil pengamatan yang didapatkan, dicatat dalam bentuk data tabel.

h. Pembuatan Pewarnaan Harris Hematoxylin Eosin

Bahan pewarnaan :

- | | |
|--------------------------------|-----------|
| a. Hematoxylin kristal | : 5 g |
| b. Alkohol Absolut | : 50 g |
| c. Ammonium (potassium alkena) | : 100 g/L |
| d. Aquadest | : 1000mL |
| e. <i>Mercury oxide</i> | : 2,5 g |

Cara kerja :

Larutan potassium alkena (ammonium) dimasukkan ke dalam air dan dipanaskan, kemudian ditambahkan Hematoxylin kristal yang telah

dilarutkan pada alkohol absolut. Campuran larutan tersebut dididihkan selama 1 menit sambil diaduk, lalu secara perlahan-lahan ditambahkan *mercury oxide* sampai berwarna jingga gelap. Setelah itu, larutan dikeluarkan dari panas dan segera didinginkan. Untuk memperjelas pewarnaan inti ditambahkan 2-4 mL asam asetat glasial per 100 mL larutan. Larutan ini perlu disaring sebelum digunakan.

2. Pengukuran Ketebalan Lapisan Granulosa

Pengukuran ketebalan lapisan granulosa dilakukan dengan menggunakan mikrometer. Mikrometer dipasang pada lensa okuler kemudian dikalibrasi terlebih dahulu. Ketebalan lapisan granulosa diukur dari membran basalis terdalam sampai membran basalis terluar pada tahapan folikel primer, sekunder, tersier dan folikel Graaf.

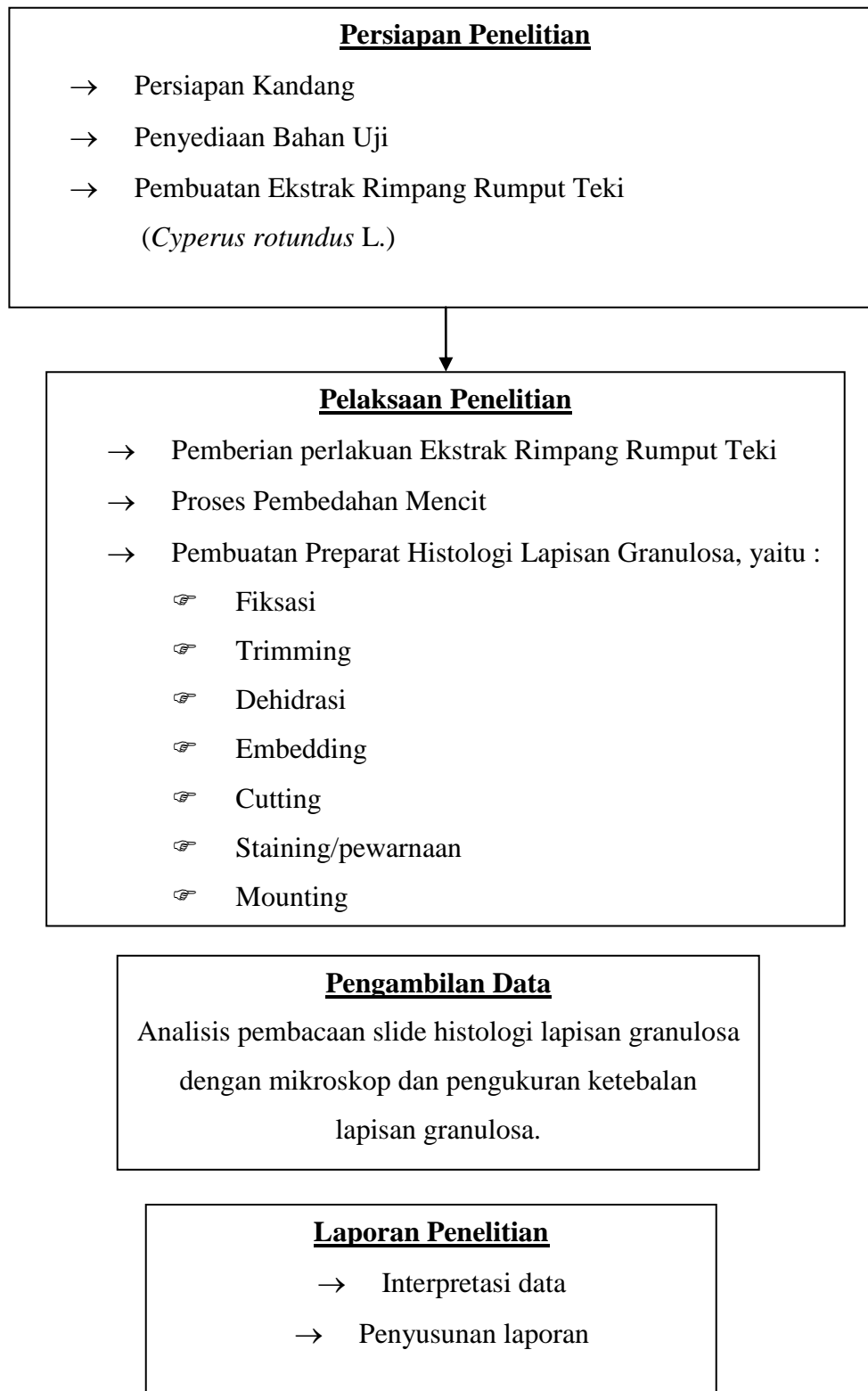
3. Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah ketebalan lapisan granulosa yang terjadi pada berbagai tahap folikuler yaitu : folikel primer, sekunder, tersier dan folikel Graaf yang diukur dari membran basalis terdalam sampai membran basalis terluar pada setiap folikel.

E. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam (ANARA). Apabila diperoleh perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji BNT dengan derajat kepercayaan 5%.

Metode RAL digunakan karena unit eksperimen dianggap bersifat homogen dan perlakuan diberikan secara acak. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok perlakuan dengan 6 kali pengulangan.



Gambar 11. Diagram Alir Penelitian