

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli – Oktober 2009. Perlakuan terhadap hewan uji mencit betina, dilaksanakan di Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi FMIPA Unila. Pembuatan ekstrak rimpang rumput teki dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Unila. Dan untuk pembuatan preparat histologi ovarium mencit betina dan pengamatannya dilaksanakan di Laboratorium Patologi Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung.

#### **B. Alat dan Bahan**

##### **1. Alat**

Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak rimpang rumput teki dalam penelitian ini antara lain : gunting untuk memotong rimpang rumput teki, baskom untuk mencuci rimpang rumput teki, kertas kopi sebagai alas untuk mengangin-anginkan rimpang rumput teki, lemari pengering, ayakan *mesh*, oven, timbangan, dan *rotary evaporator* untuk memekatkan ekstrak rimpang rumput teki. Untuk perlakuan terhadap mencit alat yang digunakan

antara lain : kandang mencit sebanyak 6 kandang, masing-masing kandang berisi 4 ekor mencit, bak sebagai tempat untuk mencit sebelum diaklimatisasi, spluit yang telah ditumpulkan 1 ml dan pipa karet kecil untuk pencekakan ekstrak rimpang rumput teki pada mencit, seperangkat alat bedah untuk membedah mencit dan mengambil organ reproduksinya. Untuk proses pembuatan preparat histologi oosit, alat-alat yang digunakan antara lain : pisau, pisau mikrotom, mikrotom geser, pinset skapel, *embedding cassette*, oven, cangkir logam, cetakan *paraffin*, balok kayu, kuas, *flotation bath*, inkubator, *stopwatch*, api gas, *tissue prosesor*, *obyek glass* dan *cover glass*, serta kertas label untuk memberi tanda preparat histologi oosit. Selain itu digunakan mikroskop untuk pengamatan preparat histologi, dan kamera untuk dokumentasi.

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini antara lain: 24 ekor mencit betina fertil dengan umur berkisar antara 3 - 4 bulan dengan berat badan 30 – 40 gram/ekor, pellet ayam sebagai pakan mencit selama perlakuan, ekstrak rimpang rumput teki, *aquabidest*, *kloroform* sebagai obat bius, *buffer formalin* 10% sebagai larutan fiksasi, alkohol 80% dan 90% untuk dehidrasi, alkohol absolut dan *Xylol* untuk *clearing*, *paraffin* untuk *impregnasi*, *paraplast (paraffin cair)* untuk meletakkan organ, *canada balsam* untuk melekatkan *slide* preparat dengan *cover glass*, seperangkat zat pewarna HE (*Hematoxylin-Eosin*), dan etanol sebagai pelarut dalam pembuatan ekstrak rimpang rumput teki.

## C. Prosedur Penelitian

### 1. Persiapan Kandang

Sebelum penelitian ini dilaksanakan, terlebih dahulu disiapkan kandang untuk hewan uji yang terbuat dari triplek dan kawat dengan ukuran 15 x 75 cm, sebanyak 6 kandang. Masing-masing kandang disekat-sekat menjadi 5 bagian untuk memisahkan mencit yang satu dengan yang lainnya dengan perlakuan yang berbeda.

### 2. Persiapan Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit betina fertil dengan umur berkisar antara 3 sampai 4 bulan dengan berat badan sekitar 30 – 40 gram/ekor, yang didapatkan dari kandang hewan uji Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung.

Sebelum penelitian dilaksanakan mencit terlebih dahulu diaklimatisasi selama satu minggu dalam kandang yang telah disiapkan yang bertujuan untuk penyesuaian mencit terhadap lingkungan dan perlakuan yang berbeda, serta untuk membatasi pengaruh lingkungan dalam percobaan.

Setiap hari sekitar pukul 08.00 WIB mencit diberi pakan berupa pellet ayam dan air minum secara *adlibitum*.

### 3. Persiapan dan Pembuatan Ekstrak Rimpang Rumput Teki

Rimpang rumput teki yang akan digunakan sebagai ekstrak didapat dari sekitar kawasan Way Kandis Bandar Lampung, dengan menggunakan acuan buku taksonomi tumbuhan Gembong Tjitrosoepomo tahun 1993. Rumput teki yang telah didapat, diambil bagian rimpangnya. Rimpang dibersihkan dan dicuci menggunakan air untuk menghilangkan sisa tanah, setelah dibersihkan rimpang diangin-anginkan di atas kertas kopi selama 2 – 3 hari. Rimpang yang telah kering dikumpulkan dan ditimbang beratnya hingga mencapai  $\pm 500$  gram. Rimpang tersebut dimasukkan ke dalam lemari pengering pada suhu tidak lebih dari  $50^{\circ}\text{C}$  untuk menghilangkan kadar air yang masih terkandung dalam rimpang. Pengovenan dilakukan sampai rimpang dapat dijadikan serbuk dengan cara digiling dan serbuk dihaluskan dengan menggunakan mesh 48. Serbuk yang didapat dibuat ekstraknya dengan cara maserasi. Maserasi merupakan metode perendaman sampel dengan pelarut organik atau semi organik, umumnya digunakan pelarut dengan molekul relatif kecil seperti metanol dan etanol. Dalam hal ini pelarut yang kita gunakan adalah etanol 99 %. Maserasi dilakukan pada temperatur ruangan, sehingga pelarut mudah terdistribusi ke dalam sel tumbuhan. Hasil isolasi dalam jumlah pelarut yang cukup banyak dapat dipekatkan dengan evaporator rotasi. Untuk menghindari panas pada proses pemekatan dapat digunakan vakum dengan pengaliran air, sehingga dalam alat akan terjadi pengurangan tekanan dan pelarut akan menguap pada temperatur dibawah titik didih ekstrak, diharapkan senyawa tidak akan terdegradasi selama proses pemekatan atau

pengurangan pelarut karena tidak menggunakan panas (Darwis, 2003). Pemekatan dilakukan pada suhu 35 °C dengan kecepatan 60 rpm selama  $\pm 2$  jam. Hasil yang diperoleh berupa ekstrak kasar yang masih mengandung pelarut etanol. Untuk menghilangkan senyawa pelarut, ekstrak yang diperoleh dimasukkan ke dalam botol kaca ukuran kecil yang ditutup dengan aluminium foil yang diberi celah udara agar pelarut yang menguap dapat keluar dari dalam botol, sehingga hasil akhir yang diperoleh adalah ekstrak rimpang rumput teki dalam bentuk pasta yang dapat dilarutkan dengan aquabides (Taufiqurrahman dan Wibowo, 2000).

#### **4. Penetapan Dosis dan Pemberian Perlakuan**

Menurut Sa'roni dan Wahjoedi (2002), perlakuan yang diberikan pada tikus putih yaitu :

1. Kelompok kontrol dengan diberi 1 ml/100 gBB (A)
2. Kelompok dengan dosis 11,25 mg/100 gBB dalam 1 ml/100 gBB (B)
3. Kelompok dengan dosis 112,5 mg/100 gBB dalam 1 ml/100 gBB (C)
4. Kelompok dengan dosis 337,5 mg/100 gBB dalam 1 ml/100 gBB (D)

Pada penelitian ini dosis diberikan pada mencit betina yang beratnya 30 – 40 gram/ekor, perhitungan dosis terlampir pada lampiran 2.

Dosis yang diberikan dengan perbandingan 2,5 x berat badan mencit dari berat badan tikus putih, sehingga dosis ekstrak rimpang rumput teki yang diberikan adalah :

1. Kelompok kontrol dengan diberi 96 ml aquabides (K)
2. Kelompok dengan dosis 1,256 ml/40 gBB dalam 96 ml aquabides (PI)
3. Kelompok dengan dosis 12,56 ml/40 gBB dalam 96 ml aquabides (PII)
4. Kelompok dengan dosis 37,67 ml/40 gBB dalam 96 ml aquabides (PIII)

Hewan uji terlebih dahulu dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok. Pemberian ekstrak rimpang rumput teki pada mencit betina dilakukan secara oral dengan menggunakan spuit yang ujungnya ditumpulkan dan diberi pipa karet kecil untuk memudahkan pencekokan. Perlakuan ini dilakukan 1 kali sehari selama 14 hari.

##### **5. Proses Pembedahan Mencit**

Setelah mencit diberi perlakuan selama 14 hari, pada hari ke-15 dilakukan pembedahan untuk diambil ovariumnya. Sebelum dilakukan pembedahan mencit terlebih dahulu dibius dengan *kloroform*, kemudian setelah mencit tidak bergerak lagi mulailah 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, guna mendapatkan 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 oosit dapat diamati.

## 6. Pembuatan Preparat Histologi Oosit

Perkembangan dari oosit di evaluasi melalui gambaran histologi dari ovarium. Adapun prosedur pembuatan preparat histologi yang dilakukan terhadap jaringan ovarium adalah sebagai berikut :

(Luna. LEE G, HT (ASCP), 1968).

### a. Trimming

Spesimen berupa ovarium dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan larutan fiksasi, yang sebelumnya spesimen difiksasi terlebih dahulu dengan larutan fiksatif formalin 10 % dengan perbandingan antara volume spesimen dengan larutan 1 : 10 untuk mendapatkan hasil yang baik. Kemudian jaringan specimen 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 pada tabel 1:

<b>Tahap</b>	<b>Waktu</b>	<b>Zat Kimia</b>
<b>Dehidration</b>	2 jam	Alkohol 80%
	2 jam	Alkohol 95%
	2 jam	Alkohol 95%
<b>Clearing</b>	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
<b>Impregnasi</b>	2 jam	Paraffin I
	2 jam	Paraffin II
	2 jam	Paraffin III

### c. Embedding

Setelah proses dehidrasi, maka jaringan yang berada dalam embedding cassette dipindahkan ke dalam "base mold", kemudian diisi dengan paraffin cair (*paraplast*) dimasukkan ke dalam cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu di atas 58<sup>0</sup>C. Tuangkan *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 berukuran 3 x 3 cm. Jaringan yang sudah diletakkan pada balok kayu atau cassette disebut blok paraffin. Fungsi dari balok kayu atau cassette adalah untuk memegang pada saat blok dipotong pada 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  $\mu\text{m}$ . Setelah blok dipotong, pilih lembaran yang baik, apungkan pada air dan kerutannya dihilangkan dengan cara salah satu sisi lembaran jaringan tersebut ditekan dengan ujung jarum, di sisi lain ditarik dengan kuas runcing. Lembaran jaringan tersebut ke dalam *waterbath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna. Kemudian lembaran jaringan tersebut dipindahkan ke dalam *waterbath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna. Dengan gerakan disedot, jaringan tersebut diambil dengan *slide* bersih dan tempelkan di tengah atau sepertiga atas/bawah. Dicegah agar jangan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan. Setelah itu *slide* yang telah berisijaringan ditempatkan pada inkubator (37<sup>0</sup>C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna pada *slide*. Kualitas hasil cutting sangat tergantung pada keterampilan dan pengalaman serta pengetahuan yang mendalam

tentang peralatan yang akan dipakai dan karakteristik jaringan yang akan dipotong.

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

Setelah pembuatan *slide* preparat selesai, dilakukan pengamatan dibawah mikroskop untuk melihat preparat yang terbaik sebelum dilakukan pewarnaan. Proses selanjutnya adalah pewarnaan dengan menggunakan pewarna HE, proses pembuatan pewarnaan HE yaitu :

Bahan pewarnaan :

- |                                |          |
|--------------------------------|----------|
| a. Hematoxylin kristal         | : 5 g    |
| b. Alkohol Absolut             | : 50 ml  |
| c. Ammonium (potassium alkena) | : 100 g  |
| 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. Tambahkan *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.

Dalam proses pewarnaan secara berurutan *slide* dimasukkan ke

dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut, seperti

pada tabel 2 :

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 jaringan pada slide diwarnai, dilakukan mounting dengan cara meneteskan bahan mounting (canada balsam) sesuai dengan kebutuhan dan ditutup dengan cover glass dengan cepat agar tidak ada gelembung udara yang terbentuk.

**g. Pembacaan Slide Dengan Mikroskop**

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

**7. Pengukuran Diameter Oosit**

Pengukuran diameter oosit dilakukan dengan menggunakan mikrometer. Mikrometer dipasang pada lensa okuler, yang sebelumnya dikalibrasi terlebih dahulu.

**8. Parameter Yang Diamati**

Parameter yang diamati dalam penelitian ini yaitu struktur oosit meliputi diameter oosit mencit betina (*Mus musculus* L.) setelah pemberian ekstrak rimpang rumput teki (*Cyperus rotundus* L.).

## 9. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 6 kelompok pengulangan dan masing-masing kelompok diberi 4 perlakuan yang berbeda, yaitu : kelompok dengan perlakuan kontrol yang diberi 96 ml aquabides(K), kelompok dengan perlakuan dosis 1,256 ml /40 gBB dalam 96 ml aquabides (PI), kelompok dengan perlakuan dosis 12,56 ml/40 gBB dalam 96 ml aquabides (PII), dan kelompok dengan perlakuan dosis 37,67 ml/40 gBB dalam 96 ml aquabides (PIII). Kemudian data yang didapat dianalisis dengan Analisis Ragam (ANARA). Apabila diperoleh perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada taraf 5%.

#### D. Diagram Alir Penelitian

