

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental sesungguhnya (*true experimental*) dengan pendekatan *post test only control group design*. Penelitian eksperimental dilakukan dengan serangkaian kegiatan percobaan untuk mengetahui gejala maupun pengaruh yang ditimbulkan karena perlakuan tertentu. Salah satu jenis penelitian eksperimental adalah *true eksperimental* yaitu rancangan eksperimental yang memenuhi tiga syarat, yaitu ada kelompok kontrol, ada random, dan ada replikasi (Notoatmodjo, 2010 dan Zainuddin, 2011). Sedangkan pendekatan *post test only control group design* adalah salah satu jenis pendekatan pada *true experimental* dimana fenomena yang terjadi akibat adanya perlakuan atau intervensi dari peneliti (respon) hanya diamati setelah perlakuan atau intervensi tersebut diberikan.

Perlakuan terhadap hewan coba pada penelitian ini dengan dilakukan tindakan ovariektomi untuk menciptakan kondisi hipoestrogen yaitu terjadi pada 28 hari pasca ovariektomi (Wiyasa, 2012) hal ini ditandai dengan kenaikan pH vagina sampai lebih dari 7,3 (Yuliani, 2014). Terdapat perbedaan pH vagina tikus dengan pH vagina perempuan, pH vagina tikus lebih tinggi dibandingkan pH vagina perempuan. pH vagina tikus dengan pemberian estradiol adalah rata-rata 6,3 dan berkisar antara 5,7 sampai 7,3 dikategorikan asam, sedangkan pH vagina perempuan dikategorikan asam bila berkisar antara 3,4 sampai 4,5 (Spencer *et al.*, 2004). Setelah pengukuran pH, dilanjutkan dengan pemberian ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) dengan berbagai dosis mengacu

pada penelitian yang dilakukan oleh Khusniyati (2014) yaitu 1,25 mg/kgBB/hari, 2,5 mg/kgBB/hari, dan 5 mg/kgBB/hari (Khusniati *et al.* 2014; Azizah *et al.* 2014; Yulinda *et al.* 2014). Sebelum diberikan, ekstrak kacang tunggak dilarutkan terlebih dahulu dengan *aquabides*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Tempat Penelitian

- Pemeliharaan tikus, tindakan ovariektomi dan terminasi di Laboratorium Farmakologi FKUB
- Pengekstrakan kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA UB
- Pemeriksaan kandungan ekstrak kacang tunggak dengan metode LC-MS di Polinema (Tian, 2004)
- Pembuatan preparat dengan pewarnaan HE di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB
- Pengukuran ketebalan endometrium di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB.

4.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 65 hari.

4.3 Sampel dan Replikasi Penelitian

4.3.1 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah hewan coba berupa tikus putih Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tikus yang sering digunakan

sebagai hewan percobaan merupakan strain albino dari *Rattus norvegicus* yaitu *Galur Wistar* yang lebih tahan terhadap perlakuan ovariektomi serta mempunyai ukuran tubuh tidak terlalu kecil, disamping itu tikus tidak dapat memuntahkan kembali isi perutnya (Putra, 2009 dan Kusumawati, 2004). Selain itu, juga dibutuhkan kriteria inklusi, eksklusi, serta pembagian kelompok hewan coba :

a. Kriteria Inklusi

Untuk menjaga homogenitas sampel maka diberlakukan kriteria inklusi sebagai berikut:

- 1) Jenis kelamin betina.
- 2) Umur 9 - 12 minggu
- 3) Berat badan 150 – 250 gram.
- 4) Tikus Sehat (aktif bergerak, tidak cacat dan tidak ditemukan luka di tubuh).

(Tuffery, 1995; Wiyasa, 2012; Khusniyati, 2014)

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Tikus sakit (karena infeksi dan diare)
- 2) Tikus digunakan pada penelitian sebelumnya
- 3) Tikus bunting / hamil

c. Pembagian Kelompok Hewan Coba

Tikus yang telah sesuai dengan kriteria inklusi dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol, yang masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Pembagian kelompok tikus dilakukan dengan secara acak (*simple randomized sampling*).

Pembagian kelompok tikus tersebut diatas adalah sebagai berikut :

- 1) Kelompok kontrol (+) : kelompok tikus yang diovariectomi dan tidak diberi ekstrak KT
- 2) Kelompok perlakuan 1 : kelompok tikus yang diovariectomi dan diberi ekstrak KT dengan dosis 1,25 mg/kgBB/hari
- 3) Kelompok perlakuan 2 : kelompok tikus yang diovariectomi dan diberi ekstrak KT dengan dosis 2,5 mg/kgBB/hari
- 4) Kelompok perlakuan 3 : kelompok tikus yang diovariectomi dan diberi ekstrak KT dengan dosis 5 mg/kgBB/hari

4.3.2 Replikasi Sampel

Besar sampel atau dalam penelitian ini disebut sebagai replikasi yang merupakan banyaknya tikus yang digunakan dalam setiap kelompok sampel penelitian. Replikasi adalah banyaknya unit eksperimen, yang mendapat perlakuan sama pada kondisi tertentu (Zainuddin, 2011). Hidayat (2010) menyebutkan bahwa untuk banyaknya replikasi ditentukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan:

t = banyaknya kelompok

r = jumlah replikasi (banyaknya ulangan) pada tiap kelompok perlakuan

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

$$3r - 3 \geq 15$$

$$r \geq \frac{18}{3}$$

$$r \geq 6$$

Berdasarkan rumus di atas maka ditemukan jumlah replikasi adalah 6.

Sehingga jumlah keseluruhan sampel menjadi 4 kelompok x 6 menjadi 30 ekor.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Pemberian ekstrak kacang tunggak dalam dosis 1,25 mg/kgBB/hari; 2,5 mg/kgBB/hari; 5 mg/kgBB/hari.

4.4.2 Variabel Tergantung

Ketebalan endometrium tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*)

4.5 Definisi Operasional

a. Ovariektomi

Ovariektomi dilakukan dengan pengambilan organ ovarium kanan dan kiri tikus yang bertujuan untuk menyebabkan kondisi hipoestrogen (Khajuria *et al*, 2012) .

b. Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*)

Merupakan tanaman kacang tunggak yang dipanen saat tua, dibungkus dalam plastik dengan kondisi kering dan berasal dari daerah Nusa Penida-Bali (Yulindawati, 2016).

c. Dosis ekstrak kacang tunggak

Pemberian ekstrak kacang tunggak dengan dosis 1,25 mg/kgBB/hari, 2,5 mg/kgBB/hari dan 5 mg/kgBB/hari selama 30 hari dimulai saat tikus telah mengalami kondisi hipoestrogen (diperiksa pH vagina tikus > 7,3 dengan alat pH indikator strip MERCK) (Khusniyati *et al.*, 2014; Spencer *et al.*, 2004).

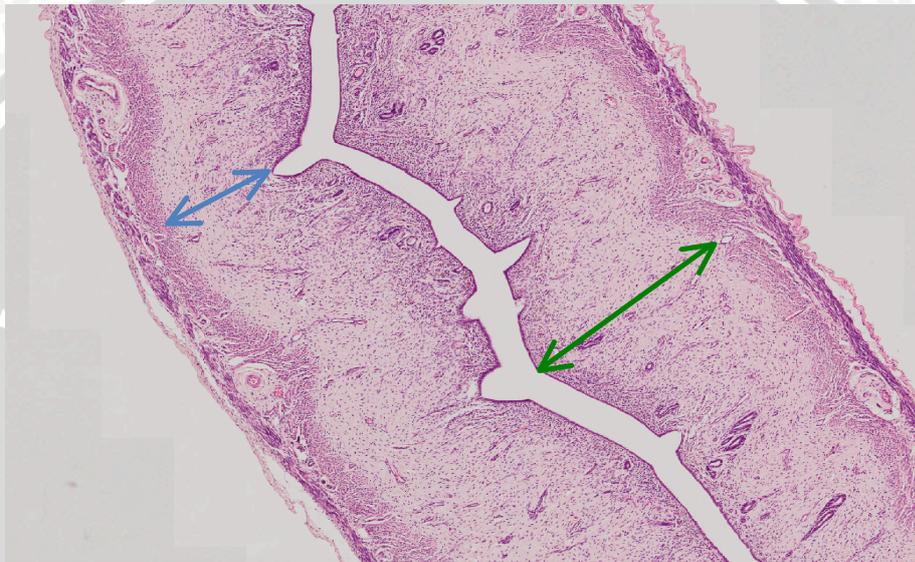
Skala: Rasio

d. Ketebalan Endometrium

Ketebalan endometrium diukur dari panjang lapisan fungsionalis hingga basalis dengan menghitung rerata dari pengulangan sebanyak 5 kali tebal terpanjang dan terpendek pada setiap sayatan longitudinal dengan

perwarnaan HE. Penghitungan menggunakan dot slide mikroskop pencahayaan Olympus XC 10 dan *software Olyvia* dengan perbesaran 400x, dan satuan ketebalan endometrium adalah μm (Wahyuni, 2014).

Skala: Rasio



Gambar 4.1 Contoh Penentuan Tebal Terpanjang () dan Tebal Terpendek () Ketebalan Endometrium Pada Sayatan Longitudinal Dengan Pewarnaan HE.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

a. Alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba

1) Kandang

a) Ukuran Kandang : berupa box plastik berukuran 40 cm x 30 cm x 20 cm, ditutup dengan kawat berjaring.

b) Jumlah kandang : pada masa aklimatisasi, kandang sebanyak 5 buah diisi dengan sekam sebagai alas. Masing-masing kandang ditempati

2 tikus. Setelah ovariektomi, tikus dipisahkan dalam kandang masing-masing 1 kandang ditempati 1 tikus.

2) Tempat minum di masing-masing kandang

b. Alat Menimbang Tikus

1) Timbangan atau neraca digital

2) Log Book

c. Bahan dan Alat Ekstrak Kacang Tunggak

1) Bahan :

a. 10 kg kacang tunggak yang diperoleh dari petani I Wayan Kanca di daerah Nusa Penida - Bali

b. Metanol for Analisis

2) Alat :

a) Timbangan

b) Pengaduk

c) Blender

d) Kertas saring *Whatman*

e) *Rotary evaporator*

f) Oven

d. Alat dan Bahan Ovariektomi

1) Alat :

a) 1 set alat bedah termasuk pisau scalpel no.11

b) Spuit 1 cc

c) Meja operasi kecil

d) Baki plastik

e) Sarung tangan



- f) Duk steril
 - g) Korentang
 - h) Bengkok
 - i) Kandang pemulihan
- 2) Bahan :
- a) Agen anestesi (kombinasi :Ketamin 80 mg/kg dan xylazine 10 mg/kg)
 - b) etanol
 - c) povidon iodine
 - d) Benang cat gut (cromik 3/0 dan silk3/0)
 - e) Kassa steril
- e. Alat dan Bahan untuk Swab Vagina
- 1) Alat : pH indikator strip MERCK, *cotton swab*
 - 2) Bahan : secret mukosa vagina yang berada di introitus vagina tikus
- f. Alat Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak kepada Hewan Coba
- 1) Botol dengan penutup
 - 2) Spuit 1 ml
 - 3) Spuit yang ujungnya dipasang platina (sonde)
- g. Alat untuk Pengambilan Jaringan Uterus Tikus
- 1) Alat bedah minor (gunting, pinset, klem, pemegang jaringan)
 - 2) Wadah kecil sebagai tempat penyimpanan jaringan sementara sebelum dibuat preparat histopatologi
 - 3) Papan untuk meja pembedahan
 - 4) Handscon
 - 5) Buffer formalin 10%
- h. Alat dan Bahan Pembuatan Sediaan Histopatologi Endometrium

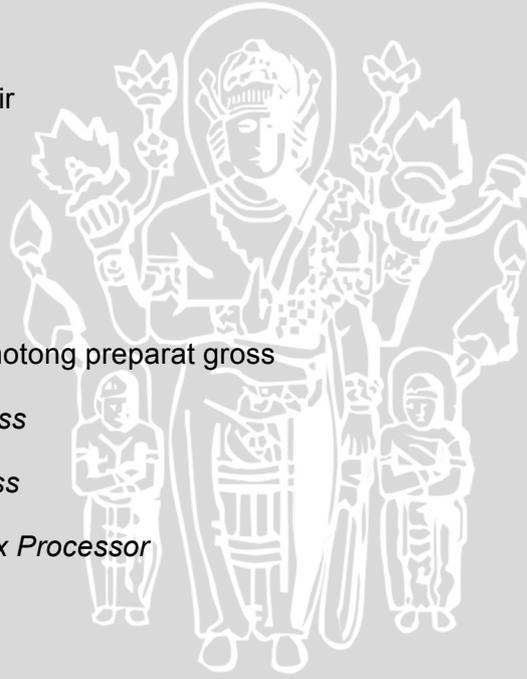
1) Bahan :

- a. Sediaan organ uterus tikus
- b. Formalin 10%
- c. Cat utama Harris Hematoksilin
- d. Cat pembanding Eosin 1%
- e. Amonia air
- f. Alkohol asam
- g. Xylol
- h. Alkohol (70%, 80%, 96%, Absolut)
- i. Entellan
- j. Parafin Cair
- k. Aquades

2) Alat :

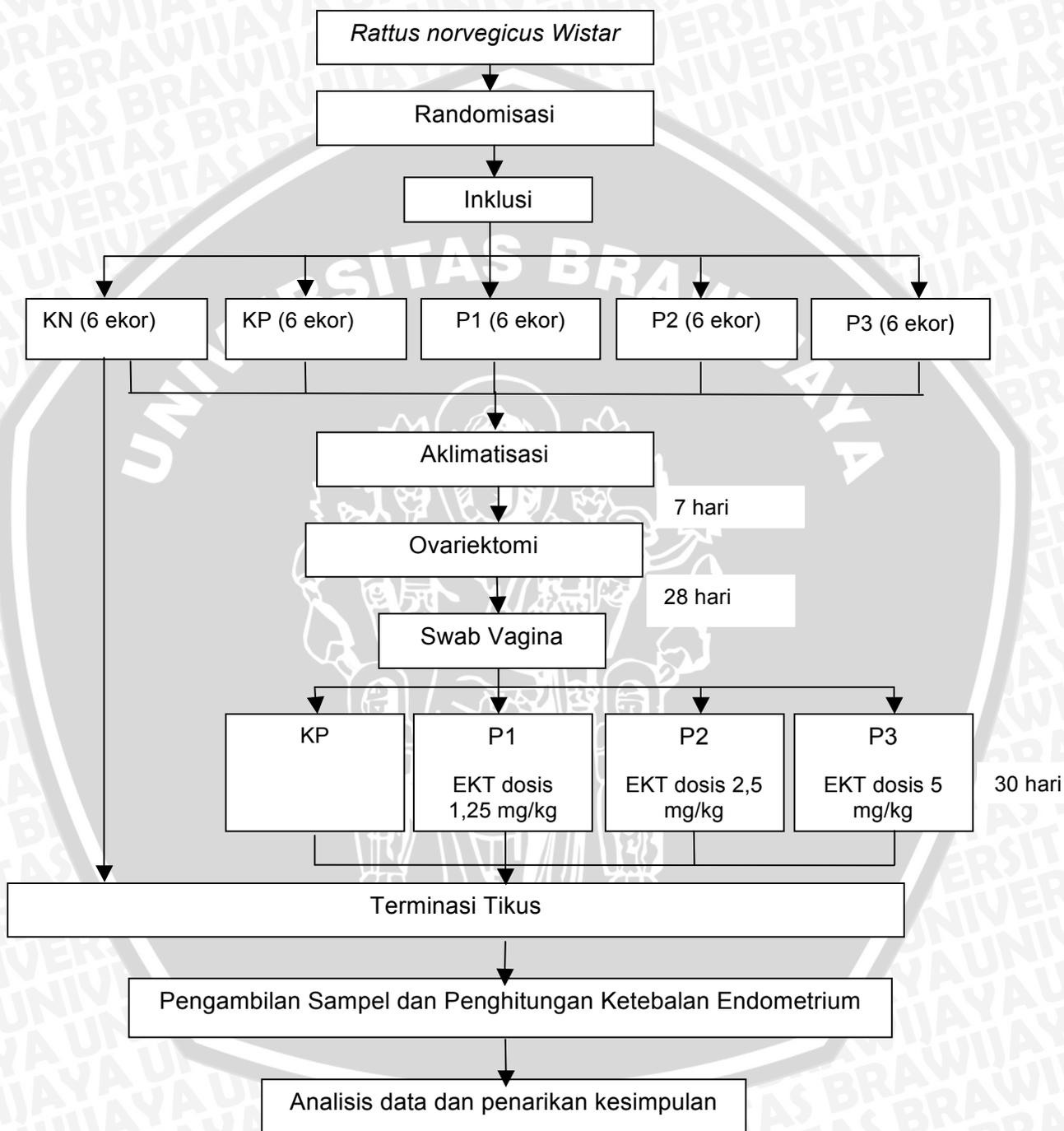
- a) Mikrotom
- b) Pisau pemotong preparat gross
- c) *Object glass*
- d) *Cover glass*
- e) *Tissue Tex Processor*
- f) Oven
- g) Kaset
- i. Alat Pengukuran Ketebalan Endometrium

Dot slide mikroskop pencahayaan Olympus XC 10 dengan *software Olyvia*



4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.2 Diagram Alur Penelitian

4.7.2 Prosedur Perawatan Hewan Coba

- a. Hewan coba ditempatkan pada kandang yang terbuat dari bahan plastik, ditutup dengan kawat kasa halus. Kandang diletakkan pada suhu ruang 20-28°C. Kandang diberi alas sekam setebal 0,5 – 1 cm dan diganti 2 kali setiap minggu pada hari Senin dan Jumat. Cahaya ruangan di control persis jam 12, jam terang (pukul 06.00 sampai dengan pukul 18.00) dan 12 jam gelap (pukul 18.00 sampai dengan pukul 06.00 esok harinya)
- b. Tikus diberi pakan standar dan minum secara *ad libitum*. Pakan standar dibuat dari campuran produk pakan ternak dengan tepung terigu dengan perbandingan 3 banding 1 dengan kandungan Vitamin B1, Vitamin B2, Asam Folat, Zat Besi dan Zn.

Tabel 4.1 Komposisi Pakan Standar di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya

Komposisi	Jumlah
Air	Maksimal 12%
Protein Kasar	12 – 14%
Lemak Kasar	Minimal 4%
Serat Kasar	Maksimal 6%
Abu	Maksimal 7,5%
Kalsium	0,9 – 12%
Fosfor	0,6 – 0,8 %

Sumber : Laboratorium Farmakologi FKUB, 2015

Pakan standar kering sebanyak 20-25 g/ekor, kemudian di tambahkan air dan ditimbang menjadi 40-50 g/ekor. Minum tikus diletakkan pada botol minuman dengan kebutuhan harian 60 ml/ekor.

- c. Pengukuran berat badan tikus dilakukan setiap minggu sekali.

4.7.3 Prosedur Ekstraksi Kacang Tunggak di Laboratorium Kimia Organik

Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

- a. Biji kacang tunggak diangin-anginkan di suhu ruang, kemudian ditumbuk hingga menjadi bubuk halus
- b. Bubuk KT dimasukkan ke dalam toples tertutup ukuran 2 L dan direndam dengan metanol hingga permukaan methanol melebihi permukaan bubuk KT, diaduk hingga benar-benar tercampur (homogen).
- c. Hasil adukan didiamkan selama 1 malam hingga mengendap.
- d. Diaduk setiap hari hingga 7 hari.
- e. Disaring untuk mendapatkan lapisan bagian atas yang terdiri dari metanol dan zat aktif terlarut yang terlarut.
- f. Proses diatas dilakukan hingga 3 kali.
- g. Hasil rendaman dimasukkan dalam labu evaporasi 1 L.
- h. Labu evaporasi dipasang pada evaporator dan *water bath* diisi hingga penuh.
- i. Semua rangkaian alat kemudian dipasang dan disambungkan dengan aliran listrik.
- j. Larutan metanol dibiarkan menguap pada labu evaporasi dan dibiarkan hingga berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu).
- k. Hasil ekstraksi yang berbentuk pasta kemudian dimasukkan ke dalam botol plastik/kaca dan disimpan di dalam lemari es saat sedang menunggu proses *LCMS (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry)* untuk mengidentifikasi jenis bahan aktif sekaligus kadarnya dalam ekstrak.

Didapatkan kandungan bahan aktif dalam 1 gram ekstrak kacang tunggak sebesar 40 μg dan quarcetin sebesar 55,17 ng.

4.7.4 Prosedur Ovariektomi

- a. Tikus ditimbang dengan timbangan digital untuk penentuan dosis agen anestesi
- b. Pemberian agen anestesi secara intraperitoneal
- c. Persiapan lapang operasi pada abdomen tikus. Rambut abdomen dicukur, kemudian oleskan etanol.
- d. Lakukan sebuah insisi kecil tegak lurus peritoneal (*tranverse peritoneal*) sepanjang 0,4-0,6 cm dengan pisau scalpel ukuran 11 di pertengahan abdomen dan secara ringan arahkan ke sisi kanan, mendekati puting susu kedua kanan.
- e. Setelah mencapai kavum peritoneal, jaringan adiposa ditarik sampai tuba uterina kanan dan ovarium teridentifikasi. Lakukan juga untuk tuba dan ovarium kiri. Letakkan masing-masing organ di atas duk steril.
- f. Lakukan pengikatan pada daerah distal tuba uterine, dan potong ovarium. Lakukan pada ovarium sisi sebaliknya.
- g. Masukkan kembali tuba ke dalam kavum peritoneal. Lalu jahit kembali kedalam 2 lapisan (otot dan kulit) dengan catgut. Untuk peritoneum dan otot menggunakan benang yang mudah diabsorpsi (*ethichon cromatic sutures-3/0*), sedangkan untuk kulit menggunakan benang non-absorpsi (*ethicon mersilk sutures-3/0*)
- h. Olesi bekas jahitan dengan povidon iodin
- i. Lakukan perawatan dengan teknik aseptik pada tikus post ovariektomi

(Khajuria *et al.*, 2012)

4.7.5 Prosedur Pengukuran pH Vagina Menggunakan pH Indikator Strips

MERCK

- Tikus dipegang dengan posisi terlentang
- Vagina tikus dibuka
- Gunakan *cotton swab* untuk mengambil secret mukosa vagina yang berada pada introitus vagina dan kanalis vaginalis tikus dengan 3 kali putaran searah jarum jam
- Hasil swab di oleskan pada pH indicator strips MERCK selama 1 sampai 3 detik maksimal 10 menit
- Baca hasil pemeriksaan pH indikator strips sesuai dengan standard pH indicator strips MERCK (pH 0-14) (Ferris *et al*, 2006).

4.7.6 Prosedur Pengenceran Hasil Ekstrak Kacang Tunggak

- Membuat larutan stok dengan konsentrasi ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) sebanyak 5 mg/ml
- Pengenceran ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) rumus yang digunakan :

$$V1.N1 = v2.N2$$

Keterangan : V1 : Volume larutan ekstrak yang diambil (ml)

N1 : Konsentrasi ekstrak yang diambil (mg/ml)

V2 : Volume larutan yang akan dibuat (ml)

N2 : Konsentrasi larutan yang akan dibuat (mg/ml)

Dosis 1 → 1,25 mg/kgBB/hari; BB tikus yang diperoleh = 250 g; konsentrasi ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) yang tersedia (larutan stok) 5 mg/ml; Volume diinginkan sebanyak 100 ml untuk 1 kelompok; konsentrasi yang sesuai dosis adalah

$$\frac{250 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 1,25 = 0,31 \text{ mg}$$

$$1000 \text{ g}$$

$$N1.V1 = N2.V2$$

$$5 \times V1 = 0,31 \times 100$$

$$V1 = \frac{31}{5}$$

$$V1 = 6,2 \text{ ml}$$

(6,2 ml ekstrak kacang tunggak dari larutan stok, ditambah 93,8 ml *aquabidest*). Diberikan pada tikus dosis 1 (1 cc/tikus/hari)

Dosis 2 → 2,5 mg/kgBB/hari, BB tikus yang diperoleh = 250 g; konsentrasi ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) yang tersedia (larutan stok) 5 mg/ml; volume yang diinginkan sebanyak 100 ml untuk 1 kelompok; konsentrasi yang sesuai dosis adalah

$$\frac{250 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 2,5 = 0,63 \text{ mg}$$

$$1000 \text{ g}$$

$$N1.V1 = N2.V2$$

$$5 \times V1 = 0,63 \times 100$$

$$V1 = \frac{63}{5}$$

$$V1 = 12,6 \text{ ml}$$

(12,6 ml ekstrak kacang tunggak diambil dari larutan stok, ditambah dengan 87 ml *aquabidest*). Diberikan pada tikus dosis 2 (1cc/tikus/hari)

Dosis 3 → 5 mg/kgBB/hari, BB tikus yang diperoleh = 250 g; konsentrasi ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) yang tersedia (larutan stok) 5

mg/ml; volume yang diinginkan sebanyak 100 ml untuk 1 kelompok; konsentrasi yang sesuai dosis adalah

$$\frac{250 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 5 = 1,25 \text{ mg}$$

$$N1.V1 = N2.V2$$

$$5 \times V1 = 1,25 \times 100$$

$$V1 = \frac{125}{5}$$

$$V1 = 25 \text{ ml}$$

(25 ml ekstrak kacang tunggak diambil dari larutan stok, ditambah dengan 75 ml *aquabidest*). Diberikan pada tikus dosis 3 (1cc/tikus/hari)

4.7.7 Prosedur Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak

- Empat minggu (28 hari) setelah dilakukan ovariektomi (Wiyasa, 2012)
- Berat badan tikus ditimbang tiap 7 hari sekali
- Dihitung dosis masing-masing tikus untuk 7 x pemberian selama 7 hari yaitu :

$$= \frac{\text{BB tikus} \times \text{dosis} (0,5\text{mg/kgBB atau } 2,5\text{mg/kgBB atau } 5\text{mg/kgBB}) \times 7 \text{ hari}}{1000\text{mL}}$$

- Pemberian ekstrak kacang tunggak dilakukan dengan menggunakan jarum suntik yang ujungnya tumpul.
- Memegang mencit dengan menjepit bagian tengkuk menggunakan ibu jari dan jari telunjuk, dan ekornya dijepit diantara jari manis dan kelingking
- Posisi kepala dan keadaan mulut harus diperhatikan. Ketika tikus dipegang dengan posisi terbalik pastikan posisi kepala menengadiah atau posisi dagu sejajar dengan tubuh dan mulut terbuka sedikit.
- Masukkan sonde hingga esofagus

- h. Masukkan ekstrak kacang tunggak melalui sonde
- i. Ekstrak kacang tunggak diberikan per oral melalui sonde tiap hari 1 cc selama 30 hari

4.7.8 Prosedur Terminasi Hewan Coba dan Pengambilan Sampel Organ

- a. Tikus diterminasi dengan diberi agen anestesi dengan dosis 2-3 kali dosis anestesi yaitu dengan injeksi *I.M.* Ketamin 0,6 mL
- b. Tikus yang sudah mati diletakkan diatas alas papan dengan abdomen menghadap ke atas.
- c. Tikus di ditempatkan pada alas suatu papan dengan menggunakan jarum suntik (*needle*) yang ditancapkan pada ke empat telapak kaki.
- d. Pembedahan dengan gunting pada perut tikus
- e. Dilakukan pengambilan jaringan uterus tikus
- f. Jaringan uterus dimasukkan ke dalam botol kecil yang sudah diberi kode perlakuan
- g. Sampel organ dikelompokkan berdasarkan kelompok perlakuan
- h. Setelah dilakukan pengambilan sampel, bangkai tikus yang tersisa dan tidak digunakan dikubur dengan aman sehingga tidak terjadi pencemaran lingkungan

4.7.9 Prosedur Pembuatan Spesimen Endometrium Tikus

- a. Proses Awal Untuk Preparat Gross
 - 1) Organ uterus dimasukkan ke larutan formalin 10% (fiksasi) semalam
 - 2) Organ dipilih pada daerah terbaik sesuai dengan yang akan di teliti dan dilakukan pemotongan vertikal dan horizontal agar didapatkan gambaran potongan melintang dan membujur uterus
 - 3) Dilakukan pemotongan dengan ketebalan kurang lebih 2-3 milimeter

- 4) Dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
 - 5) Dimasukkan ke larutan formalin 10% sebelum di proses / dimasukkan ke alat *Tissue Tex Processor*
 - 6) Diproses menggunakan alat / mesin *Tissue Tex Processor* selama 90 menit
 - 7) Alarm berbunyi menandakan proses sudah selesai
- b. Proses Pengeblokan dan Pematangan Jaringan
- 1) Preparat gross di angkat dari mesin *Tissue Tex Processor*
 - 2) Preparat gross di blok dengan parafin cair sesuai kode jaringan
 - 3) Setelah parafin cair mengeras dan dingin dipotong dengan alat mikrotom dengan ketebalan 3-5 mikron
- c. Proses Pewarnaan *Hematoksilin-Eosin* (HE)
- 1) Cat utama Harris Hematoksilin selama 10-15 menit
 - 2) Cuci dengan air mengalir selama 15 menit
 - 3) Alkohol asam 1% 2-5x celup
 - 4) Amonia air 3-5x celup
 - 5) Cat pembanding Eosin 1% selama 10-15 menit
- d. Proses Dehidrasi
- 1) Alkohol 70% selama 3 menit
 - 2) Alkohol 80% selama 3 menit
 - 3) Alkohol 97% selama 3 menit
 - 4) Alkohol Absolut selama 3 menit
- e. Proses Penjernihan
- 1) Dichelupkan pada larutan Xylol 2x60 menit

- 2) Cuci 3 kali dengan PBS.
- f. Proses Mounting dengan Entellan
- 1) Setiap slide diberi label.
 - 2) Satu tetes medium *mounting (Entellan)* dijatuhkan ke atas preparat.
 - 3) *Cover glass* ditutupkan ke atas preparat yang telah diberi *mounting* medium
 - 4) Selanjutnya sediaan berupa gambaran uterus siap untuk discan dengan alat scan dot pada daerah endometrium.

4.6 Analisis Data

Data yang dihasilkan dari pengukuran ketebalan endometrium pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan kemudian dianalisis secara statistik dengan menggunakan *software SPSS 23 for Mac*, dengan metode uji *One Way ANOVA* dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Sebelumnya untuk mengetahui data berdistribusi normal dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan *Kolmogorov-Smirnov* (terpenuhi bila $p > 0,05$) dan uji homogenitas data dengan menggunakan *Lavene Test* (terpenuhi bila $p > 0,05$). Berikut urutan uji statistik yang dilakukan :

- a. Uji *One Way ANOVA* untuk membandingkan rata-rata variabel terukur antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan.
- b. Uji perbandingan berganda *Least Significant Difference (LSD)* untuk mengetahui lebih rinci pasangan kelompok sampel yang saling berbeda secara bermakna dan pasangan kelompok sampel yang tidak berbeda.
- c. Analisis Korelasi *Pearson* digunakan untuk mengetahui apakah pemberian perlakuan berbagai dosis berpengaruh bermakna terhadap variabel tergantung.