

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimen. Metode penelitian eksperimen merupakan suatu metode yang berupaya menetapkan hubungan sebab akibat antara dua faktor yang sengaja dimunculkan oleh peneliti dengan cara menghilangkan atau menghapus faktor-faktor lain yang dianggap mengganggu (Arikunto, 2019).

### 3.2 Desain Penelitian

Rancangan acak lengkap (RAL) yang didalamnya terdapat kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan yang sama digunakan sebagai desain pada penelitian ini (Nazir, 2003). Rancangan ini dikatakan acak karena setiap satuannya mempunyai peluang untuk mendapat perlakuan yang sama, sedangkan dikatakan lengkap karena semua perlakuan yang diberikan digunakan dalam rancangan ini. Kelompok perlakuan terdiri dari lima kelompok perlakuan dan kontrol. Jumlah pengulangan yang dilakukan diperoleh dari Freuderer, (1991) sebagai berikut:

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

$$(6 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

T = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

15 = derajat bebas untuk RAL

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah pengulangan yang dilakukan untuk setiap perlakuan adalah  $n \geq 4$ . Mencit yang digunakan dibagi menjadi lima kelompok perlakuan pemberian ekstrak kulit semangka (*Citrullus lanatus*) dan kontrol

dimana kontrol berupa pemberian aquades. Denah pengacakan mencit dan penempatan kandang dapat dilihat pada Tabel 3.1

**Tabel 3.1** Hasil Randomisasi Mencit

1 2 F	2 21 C	3 1 A	4 6 F	5 15 B	6 5 E
8 7 C	9 13 E	10 11 B	11 17 C	12 4 B	13 19 D
15 8 D	16 24 E	17 22 F	18 3 D	19 10 D	20 14 A
22 9 A	23 23 F	24 12 C	25 16 E	26 18 A	27 20 B

Keterangan :

A : Kontrol

B : Diberi ekstrak kulit semangka (*Citrullus lanatus*) dengan dosis 140 mg/kgBB

C : Diberi ekstrak kulit semangka (*Citrullus lanatus*) dengan dosis 280 mg/kgBB

D : Diberi ekstrak kulit semangka (*Citrullus lanatus*) dengan dosis 420 mg/kgBB

E : Diberi ekstrak kulit semangka (*Citrullus lanatus*) dengan dosis 560 mg/kgBB

F : Diberi ekstrak kulit semangka (*Citrullus lanatus*) dengan dosis 700 mg/kgBB

1,2,3 dst : Nomor mencit

Berdasarkan hasil randomisasi mencit, maka dapat didapatkan penempatan mencit pada kandangnya yang dapat dilihat pada Tabel 3.2

**Tabel 3.2** Penempatan Mencit Berdasarkan Hasil Randomisasi

Kandang	Kode Mencit			
A	1	9	14	18
B	4	11	15	20
C	7	12	17	21
D	3	8	10	19
E	5	13	16	24
F	2	6	22	23

Mencit diadaptasikan dengan lingkungan baru nya dalam kandang mencit selama 14 hari sebelum diberi perlakuan. Pagi hari digunakan untuk menimbang berat badan mencit selama aklimatisasi dan perlakuan. Akan ada empat pengulangan setiap

perlakuan. Pemberian ekstrak kulit semangka dilakukan sebanyak satu kali sehari pada pagi hari. Setelah 20 hari pemberian perlakuan, mencit dibelah dan diambil organ reproduksinya. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah bobot testis, morfologi sperma, jumlah sperma serta motilitas sperma

### 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Pada penelitian ini, populasi yang digunakan merupakan mencit (*Mus musculus*) jantan galur Swiss Webster berusia 8 minggu dengan berat 25 gram. Sampel dalam penelitian ini adalah epididimis mencit jantan (*Mus musculus*) Swiss Webster berusia 8 minggu dengan berat 25 gram yang telah diberi ekstrak kulit semangka secara oral selama 20 hari.

### 3.4. Waktu dan Lokasi

Pada penelitian ini akan dilaksanakan selama kurun waktu enam bulan pada bulan Februari 2023 hingga Juli 2023. Lokasi penelitian yaitu Kebun Botani FPMIPA UPI dan Laboratorium Struktur Hewan FPMIPA UPI.

### 3.5 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada tahap pembuatan ekstrak adalah timbangan analitik, *beaker glass*, corong, blender, botol kecil, gelas ukur, *Rotary evaporator*, batang pengaduk, dan kaca arloji. Alat yang digunakan saat pemberian perlakuan adalah jarum gavage dan spuit. Alat yang digunakan saat mengambil organ testis dan epididimis adalah papan bedah, gunting, *petri dish*, pinset, jarum pentul, dan pisau bedah. Alat yang digunakan ketika pemeliharaan mencit adalah kandang mencit, dan botol minum, dan saat penimbangan berat badan mencit dan bobot testis digunakan timbangan digital (Lampiran 1).

Bahan yang digunakan pada tahap pra-penelitian adalah kulit semangka, akuades dan etanol 70%. Bahan yang digunakan saat pengambilan data adalah larutan salin 0.9%, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), pewarna *eosin*, dan kloroform.

Bahan yang digunakan pada saat pemeliharaan mencit adalah pakan mencit berupa voer 511, air, dan serbuk kayu untuk alas kandang mencit.

### 3.6 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian berikut tersusun atas sejumlah tahapan sebagai berikut:

#### 3.6.1 Persiapan Alat dan Bahan

Pada penelitian ini dipersiapkan alat dan bahan. Alat yang sudah disiapkan disterilisasi terlebih dahulu dan dilakukan pembersihan kandang sebelum hewan uji dimasukkan kedalam kandang tersebut. Bahan yang telah disiapkan, disimpan dan dilakukan pembersihan pada kulit pepaya terlebih dahulu sebelum digunakan.

#### 3.6.2 Tahap pra-penelitian

##### 1. Persiapan dan Aklimatisasi Hewan Uji

Sebelum mendapat perlakuan, hewan uji diberi waktu untuk menyesuaikan diri dengan lingkungan yang akan ditempati selama percobaan. Masa aklimatisasi ini berlangsung selama empat belas hari. Setiap perlakuan terdiri dari empat ekor mencit yang ditempatkan dalam satu kandang berukuran 40 x 31 x 13 cm.

Selama aklimatisasi, hewan coba diberi pakan dan air dengan rutin secara *ad libitum*. Setiap hari air minum diisi ulang dan tempat minum dibersihkan sedangkan kandang dibersihkan setiap tiga hari. Kegiatan tersebut bertujuan untuk mengurangi faktor-faktor yang tidak diinginkan timbul ketika penelitian berlangsung.

##### 2. Penentuan Dosis

Dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah 140 mg/kgBB, 280 mg/kgBB, 420 mg/kgBB, 560 mg/kgBB, dan 700 mg/kgBB/hari diberikan secara oral sebanyak 0.5 ml selama 20 hari (Lampiran 2). Dosis yang digunakan didukung oleh penelitian Pujiastuti (2014)

##### 3. Persiapan Ekstrak Kulit Semangka (*Citrullus lanatus*)

Pembuatan ekstrak kulit semangka menggunakan metode maserasi. Kulit semangka dicuci lalu dipotong kecil dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 80°C selama 150 menit. Kulit semangka yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi halus, ditimbang dengan timbangan analitik, dimasukan ke

dalam gelas beaker dan direndam dalam etanol 70%. Larutan diaduk hingga tercampur dan disimpan pada tempat yang gelap selama 24 jam. Hal ini dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Larutan yang sudah melalui proses maserasi dilanjutkan dengan proses evaporasi menggunakan *rotary evaporatory* yang berada di laboratorium riset UPI. Hasil evaporasi dicampur dengan Na CMC sebanyak 5 ml setiap dosis.

### 3.6.3 Tahap Pemberian Perlakuan

Mencit jantan (*Mus musculus*) diberi ekstrak kulit semangka (*Citrullus lanatus*) secara oral selama 20 hari dengan menggunakan *gavage* yang disambungkan pada sonde. Dosis perlakuan yang telah ditentukan, diberikan kepada setiap kelompok mencit. Ekstrak yang diberikan sebanyak 0.5 ml dengan dosis 140 mg/kgBB, 280 mg/kgBB, 420 mg/kgBB, 560 mg/kgBB, dan 700 mg/kgBB/hari.

### 3.6.4 Tahap Pengambilan Data

#### 1. Penimbangan Berat Badan Mencit (*Mus musculus*)

Mencit jantan (*Mus musculus*) yang dijadikan sebagai hewan uji diberi waktu dua minggu untuk menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya dan menerima pakan yang akan diberikan selama masa perlakuan. Setelah masa aklimatisasi selama dua minggu, sebanyak 24 ekor mencit jantan yang dijadikan sebagai hewan uji mendapat perlakuan selama 20 hari sesuai masing-masing kelompok perlakuan. Penimbangan dilakukan pada hari ke 1, 10 dan 20.

#### 2. Penimbangan Berat Organ Testis dan Epididimis

Mencit (*Mus musculus*) jantan yang sudah diberikan perlakuan dibedah. Testis dan epididimis ditimbang lalu epididimis dipisahkan untuk mendapatkan suspensi sperma.

#### 3. Pengamatan Kualitas Sperma

*Cauda Epididymis* yang telah dibersihkan, dipotong kecil-kecil menggunakan gunting bedah dan dilarutkan dalam *Phosphate buffer saline* (PBS) 10 ml suhu 37°C untuk mendapatkan suspensi sperma. Pengamatan jumlah sperma dilakukan dengan mengambil suspensi sperma menggunakan pipet dan dimasukkan kedalam ruang hitung *haemocytometer* lalu diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali.

Jumlah spermatozoa pada lima kamar dihitung dan dimasukkan kedalam rumus Pengamatan motilitas sperma dilakukan dengan mengambil suspensi sperma menggunakan pipet dan dimasukkan kedalam *haemocytometer* pada bilik ukuran 0.04 mm, kemudian diamati dibawah mikroskop. Pengamatan morfologi sperma dilakukan dengan mengambil suspensi sperma menggunakan pipet tetes dan dipulas pada *object glass* menggunakan pewarna etilen blue dan diamati menggunakan mikroskop. (Rudini, 2016).

Indikator dari pengamatan motilitas sperma dikategorikan sebagai sperma tidak bergerak (tingkat 1), sperma bergerak ditempat (tingkat 2), sperma bergerak tidak linear (tingkat 3) dan sperma bergerak progresif (tingkat 4). Indikator dari pengamatan morfologi sperma dikategorikan sebagai sperma sempurna (tingkat 1), sperma tidak memiliki kepala (tingkat 2), dan sperma tidak memiliki ekor (tingkat 3).

$$\text{Jumlah Sperma} = \frac{N(A+B+C+D+E)}{2} \times 10^6 \text{ sperma/ml (Rudini, 2016)}$$

Keterangan :

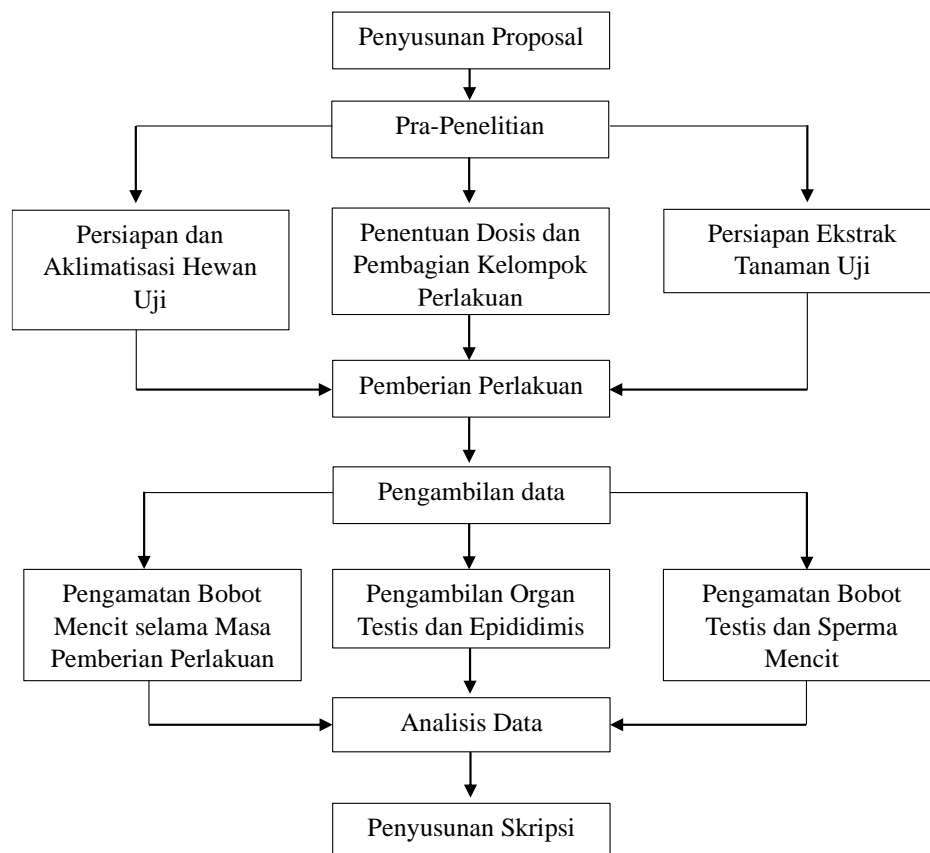
N : Jumlah sperma pada kotak A, B, C, D, dan E *haemocytometer*

### 3.7 Analisis Data

Perangkat lunak *IBM SPSS Statistics 29* digunakan untuk menganalisis data kuantitatif. Data yang diteliti adalah berat badan mencit jantan, berat testis, motilitas sperma, morfologi sperma, dan jumlah sperma. Uji *Shapiro-Wilk* digunakan sebagai uji awal dalam uji normalitas. Uji *Levene* digunakan untuk mengetahui homogenitas jika data yang terkumpul normal. Uji *One Way ANOVA* dapat digunakan untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok jika data yang terkumpul normal dan homogen.

### 3.8 Alur Penelitian

Alur penelitian dimulai dengan penyusunan proposal dan dilakukan seminar. Setelah melakukan seminar proposal, dilanjutkan dengan penelitian yang terdapat beberapa tahap yaitu tahap pra penelitian, pemberian perlakuan, dan pengambilan data. Setelah data yang diambil terkumpul, seluruh data dianalisis dan digunakan dalam penyusunan skripsi (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Bagan Alir Alur Kegiatan