

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003).

#### B. Desain Eksperimen

Desain eksperimen ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Desain ini sering digunakan jika percobaan bersifat homogen, seperti percobaan dalam laboratorium atau rumah kaca (Nazir, 2003). Secara acak mencit-mencit dikelompokkan pada setiap kelompok kontrol dan perlakuan. Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) diperoleh dari Gomez (1995), yaitu:

$$T(r - 1) \geq 20$$

$$5(r - 1) \geq 20$$

$$r \geq 5$$

Keterangan : T = jumlah perlakuan

r = jumlah replikasi

Setiap kandang diberi tanda dan nomor urut mencit. Penempatan perlakuan pada setiap kandang dilakukan secara random. Setelah dirandom, maka didapatkan penempatan perlakuan pada setiap kandang sebagai berikut :

**Tabel 3.1 Pengaturan Randomisasi Mencit**

<b>Kandang</b>	<b>No. Mencit</b>				
A	2	7	15	18	19
B	3	4	8	10	12
C	13	16	17	20	22
D	1	5	11	21	23
E	6	9	14	24	25

### C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan adalah seluruh organ testis mencit (*Mus musculus* L.) Swiss Webster jantan berumur delapan minggu. Sampel yang digunakan adalah gambaran histologis testis dan diameter tubulus seminiferus. Setiap preparat hewan coba dipilih tiga irisan dari masing-masing testis dan dipilih tiga tubulus seminiferus yang paling representatif dari masing-masing irisan, lalu dihitung diameter tubulus seminiferus dengan mikrometer okuler, untuk masing-masing kelompok perlakuan dan gambaran histologis testis.

### D. Lokasi Penelitian

Pembuatan pakan berlemak dan pakan bekatul dilakukan di Laboratorium Ekologi, Jurusan Biologi FPMIPA UPI. Pemeliharaan mencit dan pemberian perlakuan dilakukan di rumah kaca Kebun Botani FPMIPA UPI. Pembedahan dan pengambilan organ testis dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Jurusan Biologi FPMIPA UPI. Pembuatan preparat histologis testis dan penghitungan diameter tubulus seminiferus dilakukan di Laboratorium Struktur Tumbuhan FPMIPA UPI.

## E. Alat dan Bahan

### 1. Spesifikasi Alat

**Tabel 3.2 Daftar Alat**

No.	Alat-alat	Jumlah
1.	Oven	1 unit
2.	Neraca timbangan analitik	1 unit
3.	Beker glass	5 unit
4.	Tempat minum mencit	5 unit
5.	Kandang mencit	5 unit
6.	Baskom besar	2 buah
7.	Mikrometer	1 unit
8.	Pisau bedah	2 unit
9.	Meja bedah	1 unit
10.	Botol vial	25 unit
11.	Pinset	1 unit
12.	Cetakan parafin	5 unit
13.	Objek glass	2 pack
14.	Cover glass	2 pack
15.	Mikroskop	1 unit
16.	Staining jar	5 unit
17.	Mikrotom	1 unit
18.	Kuas	2 unit
19.	Magnetic stirer	1 unit
20.	Hot plate	1 unit

## 2. Spesifikasi Bahan

**Tabel 3.3 Daftar Bahan**

No.	Bahan	Jumlah
1.	Mencit jantan	25 ekor
2.	Bekatul	500 g
3.	Lemak daging sapi	250 g
4.	Larutan salin 0,9%	500 ml
5.	Pakan mencit biasa	15 kg
6.	Pakan bekatul	± 150 g
7.	Aquades	8 L
8.	Sekam	5 kg
11.	Alkohol 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%	± 2 L
12.	Parafin lunak dan keras	150 g
13.	Erilich's Haematoxylin	200 ml
14.	Eosin 2%	200 ml
15.	Haups	200 ml
16.	Entelan	50 ml
17.	Xylol	500 ml
18.	Toluol	200 ml

## F. Prosedur Kerja

### 1. Tahap Persiapan

#### a. Aklimasi Mencit

Pemeliharaan dilakukan di *green house* Kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi UPI. Mencit yang akan diberi perlakuan sebelumnya diaklimasi pada suhu ruangan rata-rata 23-26°C, proses ini dilakukan selama seminggu dengan tujuan

agar hewan uji teradaptasi dengan kondisi yang akan ditempati selama percobaan. Kemudian mencit dikelompokkan pada kandang berukuran 30 cm x 20 cm x 12 cm berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan lima ekor di setiap kandang.

Selama aklimasi, mencit-mencit tersebut hanya diberi pakan biasa dan air minum secara *ad libitum*. Makanan diberikan 5 g/ekor/hari dan botol minum dibersihkan setiap tiga hari sekali dan diganti airnya atau diisi ulang dengan air apabila air sudah habis. Aklimasi biasanya digunakan untuk menghadapi faktor-faktor yang terjadi dalam lingkungan agar lebih terkontrol di laboratorium.

#### **b. Pembuatan Pakan Berlemak**

Lemak daging sapi sebanyak 250 gram dan air yang kemudian dipanaskan, setelah itu dicampurkan dengan bahan dasar pakan standar laboratorium (pakan mencit biasa) berasal dari PT. Charoen Pokhpan Indonesia hingga beratnya mencapai satu kg lalu ditambah air sampai homogen sehingga adonan dapat dibentuk seperti pelet. Setelah itu, dikeringkan menggunakan oven.

#### **c. Penentuan Konsentrasi dan Pembuatan Pakan dengan Tambahan Bekatul**

Pada penelitian ini, bahan yang diuji adalah bekatul. Konsentrasi bekatul yang digunakan adalah 0%, 3,3%, 6,6%, 10%, dan 13,3% dari banyaknya pakan yang diberikan (6 g/ekor/hari). Penentuan konsentrasi ini berdasarkan penelitian sebelumnya dimana pemberian serat bekatul sebanyak 10% dari jumlah pakan yang diberikan (Kahlon, 2003).

**Tabel 3.4 Penentuan Konsentrari Bekatul**

No.	Konsentrasi Bekatul	Bekatul (gram)	Pakan Standart (gram)
1	0%	0	2500
2	3,3%	82,5	2417,5
3	6,6%	165	2335
4	10%	250	2250
5	13,3%	332,5	2167,5

Bekatul disaring kemudian ditimbang sesuai perhitungan diatas. Bekatul dan pakan standar dicampur dengan air hingga menjadi adonan. Adonan ini kemudian digiling menggunakan penggilingan daging hingga membentuk pelet. Pelet kemudian dikeringkan menggunakan oven.

## 2. Tahap Perlakuan

### a. Pemberian Pakan Berlemak

Setelah diaklimatisasi, mencit diberi pakan berlemak selama tujuh hari. Banyaknya pakan yang diberikan 6 g/hari/ekor. Pemberian pakan berlemak dilakukan selama seminggu, mencit diberi makan berlemak dengan komposisi perbandingan pakan dan lemak sapi 1:4 dan minum setiap hari seperti biasa. Tahap ini bertujuan untuk meningkatkan kolesterol mencit sehingga mencit mengalami *hiperkolesterolemia*. Penambahan kolesterol sebesar 200 mg tiap 100 g pakan dapat meningkatkan kadar kolesterol serum tikus putih (Iswari 1995).

### b. Pemberian Pakan Bekatul

Setelah mengalami *hiperkolesterolemia*, mencit diberi pakan dengan tambahan bekatul sesuai konsentrasi yang telah ditentukan selama 14 hari. Pakan

ini diberikan sebanyak 6 g/hari/ekor. Selama perlakuan ini mencit diberi air minum biasa.

### **3. Tahap Perlakuan**

#### **a. Pemberian Pakan Berlemak**

Setelah diaklimasi, mencit diberi pakan berlemak selama tujuh hari. Banyaknya pakan yang diberikan 6 g/hari/ekor. Tahap ini bertujuan untuk meningkatkan kolesterol mencit sehingga mencit mengalami *hiperkolesterolemia*. Penambahan kolesterol sebesar 200 mg tiap 100 g pakan dapat meningkatkan kadar kolesterol serum tikus putih (Iswari 1995). Pada tahap ini mencit diberi air minum biasa.

#### **b. Pemberian Pakan dengan Tambahan Bekatul**

Setelah mengalami *hiperkolesterolemia*, mencit diberi pakan dengan tambahan bekatul sesuai konsentrasi yang telah ditentukan selama 14 hari. Pakan ini diberikan sebanyak 6 g/hari/ekor. Selama perlakuan ini mencit diberi air minum biasa.

### **4. Tahap Pengambilan Organ**

Setelah melewati tahap perlakuan selama 14 hari, mencit dibedah untuk diambil organ testisnya. Pembedahan dan pengambilan organ dilakukan menggunakan alat-alat bedah dan dilakukan dengan hati-hati agar organ yang akan diambil tidak rusak. Organ testis kemudian dicuci dengan larutan garam. Organ testis dimasukkan kedalam botol yang berisi larutan formalin 4% untuk proses pengawetan dan fiksasi.

## 5. Tahap Pembuatan Preparat Histologis Testis

Organ testis yang telah difiksasi kemudian dibuat preparat histologisnya dengan menggunakan metode parafin dengan pewarnaan *Hematoxylin Erlich-Eosin*. Metode ini digunakan untuk melihat keadaan struktur testis yang lebih jelas.

Tahapan kerja dari metode parafin adalah sebagai berikut : fiksasi, pencucian (*washing*), dehidrasi, penjernihan (*clearing*), infiltrasi, penanaman (*embedding*), penyayatan (*sectioning*), penempelan (*affixing*), deparafinisasi, pewarnaan (*staining*), penutupan (*mounting*), dan pelabelan (*labelling*).

Organ testis yang telah difiksasi dengan larutan formalin 4% kemudian dicuci dengan akuades. Tahap berikutnya adalah dehidrasi yang dilakukan dengan merendam organ dalam larutan alkohol bertingkat (konsentrasi 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut) masing-masing larutan diganti sebanyak tiga kali setiap 30 menit. Setelah dehidrasi, dilakukan tahap penjernihan dengan larutan toluol sampai organ tampak jernih atau transparan.

Organ yang tidak jernih menunjukkan dehidrasi kurang baik sehingga organ harus didehidrasi kembali. Setelah tampak jernih, organ dapat memasuki tahap infiltrasi parafin. Tahap ini dilakukan didalam oven yaitu dengan merendam organ dalam cairan parafin dengan titik leleh 48–52°C, 52–54°C, dan 54–56°C selama masing-masing 1–2 jam. Setelah diinfiltrasi, organ ditanam dalam parafin keras menggunakan cetakan logam hingga terbentuk blok parafin dengan organ ditengahnya.



Tahap penyayatan dilakukan menggunakan mikrotom dengan ketebalan irisan 4 $\mu$ m. Irisan yang terbentuk ditempel pada gelas objek yang sebelumnya telah diolesi *haupt* atau albumin. Agar benar-benar menempel, irisan kemudian ditetesi akuades lalu diletakkan diatas *hot plate* dengan suhu 40°C hingga mengering. Tahap selanjutnya adalah deparafinisasi yaitu menghilangkan parafin yang terdapat didalam jaringan dengan cara merendam jaringan didalam larutan xilol selama 15 menit. Setelah itu, jaringan memasuki tahap pewarnaan. Langkahnya yaitu mencelupkan jaringan kedalam alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 30%, dan akuades. Setelah itu, jaringan dicelupkan kedalam larutan pewarna *Hematoxylin Erlich* selama 3–7 detik lalu dicuci dengan air. Jaringan kemudian dicelupkan kedalam alkohol 30%, 50%, 60%, dan 70%. Setelah itu, jaringan direndam dalam larutan pewarna yang kedua yaitu Eosin Y 0,5% (dalam alkohol 70%) selama 1–3 menit.

Setelah terwarnai, jaringan dicelupkan kedalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut lalu direndam dalam xilol selama 10 menit. Tahap berikutnya adalah penutupan dengan cara meneteskan jaringan dengan entelan kemudian ditutup dengan kaca penutup. Terakhir preparat diberi label dengan keterangan yang jelas. Dengan demikian jaringan siap diamati dan diambil gambarnya (Suntoro, 1983).

## 6. Tahap Pengukuran Diameter Tubulus Seminiferus

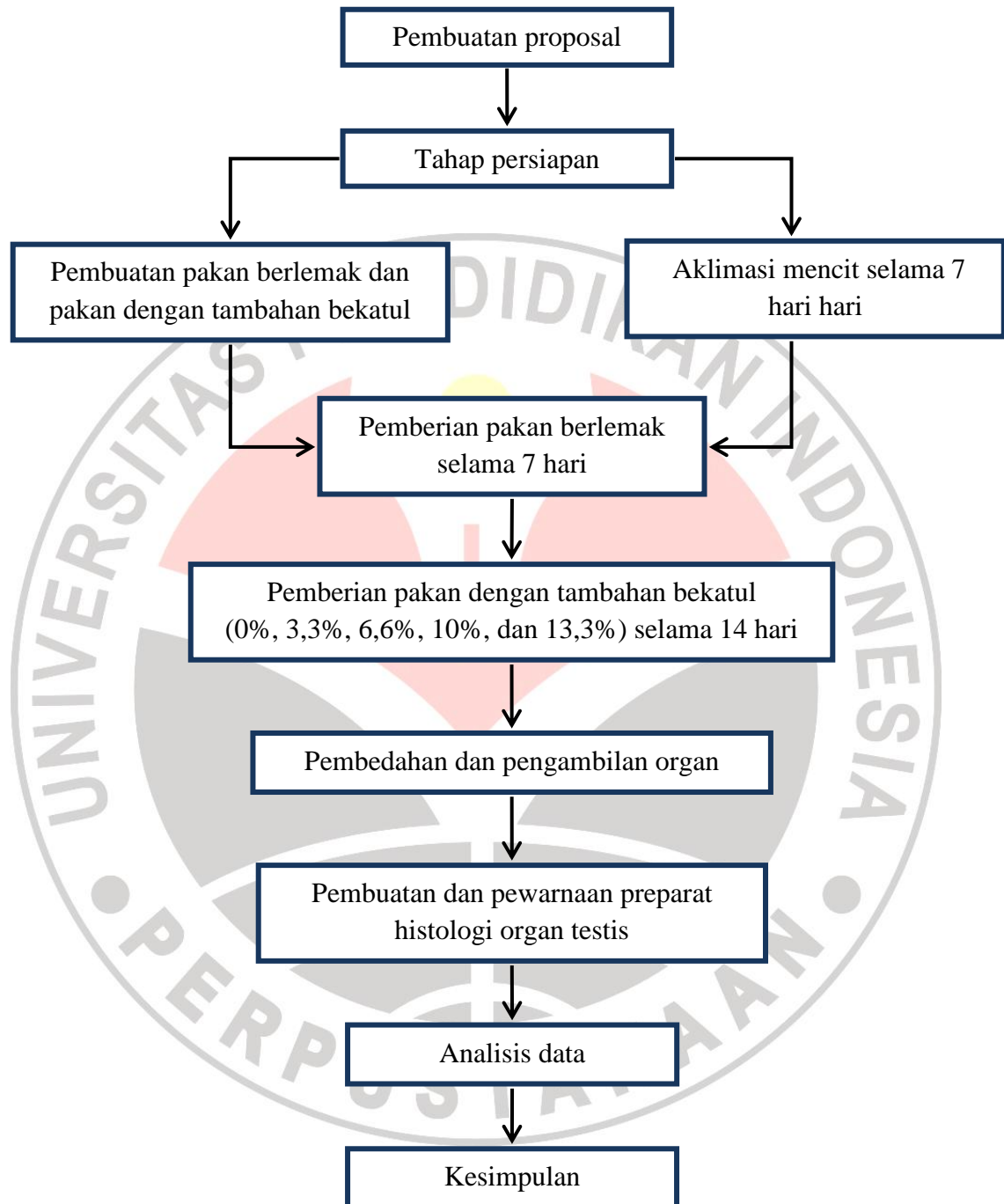
Setelah mendapatkan gambaran dari organ testis maka diameter tubulus seminiferus diukur dengan menggunakan mikrometer okuler. Mikrometer terlebih dahulu dikalibrasi dengan menghimpitkan skala mikrometer objektif dan okuler

pada perbesaran yang diinginkan. Tubulus seminiferus yang diukur diameternya yaitu jarak antara dua titik yang bersebrangan pada garis tengahnya, titik tersebut berada pada membran basalis tubulus seminiferus (Maslachah *et al*, 2004). Diameter tubulus seminiferus yang diamati pada setiap testis adalah sebanyak tiga tubulus seminiferus yang dianggap representatif dengan tiga kali pengulangan pengukuran pada tiap tubulus seminiferus.

#### **G. Analisis Data**

Data yang diperoleh berupa data kuantitatif dan data kualitatif. Data kuantitatif berupa diameter tubulus seminiferus yang kemudian di analisis secara statistika menggunakan program SPSS 16.0 Sebelumnya dilakukan uji kenormalan dan homogenitas. Pengujian dilanjutkan dengan uji *Analisis of Variance* (ANOVA), sehingga dapat diketahui perbedaan rata-rata dari masing-masing perlakuan, untuk pengamatan lebih lanjut maka analisis dilanjutkan dengan uji LSD. Data kualitatif berupa gambaran histologis testis serta membandingkan, dan mendeskripsikan setiap kelompok perlakuan dengan kontrol.

## H. Alur Penelitian



**Gambar 3.1 Diagram Alur Penelitian**