

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimen, dikarenakan terdapat pemberian perlakuan terhadap variabel yang diteliti.

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap. Rancangan ini dijadikan pilihan dalam penelitian karena perlakuan dikenakan sepenuhnya secara acak kepada unit-unit eksperimen serta dilakukan dalam skala laboratorium jadi kondisi lingkungan dianggap homogen (Sudjana, 2002:15). Selain itu, bertujuan untuk mengetahui kemungkinan adanya hubungan sebab akibat antara variable dalam penelitian. Terdapat enam perlakuan yang diberikan pada mencit jantan yakni dosis just pinang. Banyaknya pengulangan atau replikasi didapat dengan menggunakan rumus Federer (1955 dalam Nur, 2010), yaitu :

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$n \geq \frac{20}{5}$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

T = jumlah perlakuan = 6

N = jumlah replikasi = 4

Berdasarkan perhitungan diatas, maka jumlah pengulangan yang dilakukan untuk setiap perlakuan ialah $n \geq 4$. Mencit yang digunakan dibagi menjadi enam kelompok perlakuan pemberian jus biji pinang muda. Pengacakan dilakukan untuk menghilangkan bias (Sudjana, 2002;5).

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

Gambar 3.1 Penataan Pengacakan mencit dengan Enam Perlakuan

Keterangan : 1, 2, 3, ..., 24 = Nomor mencit

A = jus biji pinang dosis 0 $\mu\text{g/ml}$; (masing-masing di ulang empat

B = jus biji pinang dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$; kali) (Er, *et al.* 2005).

C = jus pinang dosis 0,3 $\mu\text{g/ml}$;

D = jus biji pinang dosis 0,5 $\mu\text{g/ml}$;

E = jus pinang dosis 0,7 $\mu\text{g/ml}$;

F = jus biji pinang dosis 1,0 $\mu\text{g/ml}$;

Baiq Indah Febriani, 2012
Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Pinang (*Areca catechu*) Terhadap Histologi Testis Mencit (*Mus musculus*)

Berdasarkan gambar 3.1 maka akan diperoleh penataan mencit berdasarkan nomor mencit yang telah didapatkan dengan cara pengacakan.

Adapun peta kandang yang didapatkan sebagai berikut:

Tabel 3.1 Peta Kandang

No.	Kandang Perlakuan	Unit Eksperimen (Mencit Nomor ke-)
1	A = 0 $\mu\text{g/ml}$	11
		13
		17
		20
2	B = 0,1 $\mu\text{g/ml}$	16
		3
		12
		21
3	C = 0,3 $\mu\text{g/ml}$	23
		1
		7
		18
4	D = 0,5 $\mu\text{g/ml}$	6
		2
		19
		10
5	E = 0,7 $\mu\text{g/ml}$	5
		24
		22
		14
6	F	8
		9
		4
		15

Baiq Indah Febriani, 2012
 Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Pinang (*Areca catechu*) Terhadap Histologi Testis Mencit (*Mus musculus*)

Sebelum ke tahap perlakuan, seluruh hewan percobaan di aklimatisasikan selama tujuh hari. Penimbangan berat badan dilakukan sebelum dan selama perlakuan. Parameter yang diukur adalah bentuk histologi mencit.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur *Swiss Webster* sedangkan sampel yang digunakan dalam penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) jantan galur *Swiss Webster* usia 4 bulan.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini di mulai bulan Maret 2011 sampai dengan Juni 2011. Pembuatan jus biji pinang dilakukan di Laboratorium Fisiologi Universitas Pendidikan Indonesia. Pemeliharaan dan pemberian jus pinang dilakukan di kandang hewan milik pribadi bertempat di jalan Darmawinata Gegerkalong Bandung, pembedahan mencit di lakukan di Laboratorium Fisiologi Universitas Pendidikan Indonesia, sedangkan peruses mikrotekhnik di lakukan di Laboratorium Struktur Hewan Universitas Pendidikan Indonesia. Jalan Dr. Setiabudhi No.229 Bandung.

E. Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Fisiologi dan Struktur Hewan Universitas Pendidikan Indonesia. Alat-alat yang digunakan selama penelitian ini terdapat pada Tabel 3.2, sedangkan daftar bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdapat pada Tabel 3.3.

Tabel 3.2 Alat-alat Penelitian

No.	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
1.	Bak plastic (kandang)	6 buah	30 x 20 x 12 cm
2.	Tempat minum mencit	6 buah	Merk
3.	Suntikan/alat gavage	2 buah	Merk Syring/981
4.	Thermometer ruang	1 buah	Merk
5.	Lumpang dan alu	1 buah	Merk
6.	Pisau bedah	2 buah	Merk BIBRAUN
7.	Gunting bedah	2 buah	Merk Nagoya Japan stainless
8.	Bak bedah	1 buah	P = 29,5 cm
9.	Jarum pentul	1 bungkus	
10.	Mikroskop cahaya	2 buah	
11.	Neraca timbangan analitik (<i>Elektrical Balance</i>)	2 buah	Merk AND, HF 300
12.	Timbangan <i>Dial-O-Gram</i>	1 buah	Merk OHAUS
13.	Sarung tangan	3 buah	
14.	Neubauer-Improved	2 buah	Neubauer-Improved
15.	<i>Tissue</i>	1 buah	Merk Nice
16.	Lap	3 buah	

17.	Kertas label	1 pak	Merk
18.	Cawan petri	3 buah	Normax
No.	Nama	Jumlah	Spesifikasi
19.	<i>Beaker glass</i> 100 ml	2 buah	Schott Duran
20.	<i>Beaker glass</i> 250 ml	1 buah	Pyrex ® Iwaki TE-32
21.	Pipet	4 buah	(Pyrex) Iwaki
22.	<i>Refrigelator</i>	1 buah	National NR-B 43 AGR
23.	Gelas ukur 10 ml	1 buah	Pyrex iwaki
24.	Gelas ukur 1000 ml	1 buah	Pyrex
25.	<i>Microscope Silides Ground Edges dan Deck Glass</i>	20 buah	25,4 x 76,2 mm; 1 mm-1,2 mm thick dan 24 x24 mm; 0,13 – 0,17 mm
26.	Botol vial	24 buah	
27.	Pinset	1 buah	
28.	Cetakan paraffin	24 buah	
29.	Objek glass	2 pak	
30.	Cover glass	2 pak	
31.	Staining jar	5 unit	
32.	Mikrotom	1 unit	
33.	Kuas	2 unit	
34.	Magnetic stirer	1 unit	
35.	Hot plate	1 unit	

Tabel 3.3 Daftar Bahan-bahan Penelitian

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	Mencit jantan	24 ekor

Baiq Indah Febriani, 2012
 Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Pinang (*Areca catechu*) Terhadap Histologi Testis Mencit (*Mus musculus*)

2.	Makanan Mencit PC 551	20 kg
3.	Biji pinang muda	1 buah
4.	Aquades	10 liter
No.	Nama	Jumlah
5.	NaCl 0,9%	1000 ml
6.	Alkohol 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%	2400 ml
7.	Eosin	100 ml
8.	Minyak emersi	10 ml
9.	Parafin lunak dan keras	150 g
10.	ERILICH's Haematoxylin	200 ml
11.	Eosin 2%	200 ml
12.	HAUPS	200 ml
13.	Entelan	50 ml
14.	Xylol	500 ml
15.	Toluol	200 ml

F. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian pada penelitian ini adalah:

1. Aklimatisasi Mencit

Pemeliharaan hewan dilakukan di rumah hewan milik pribadi bertempat di Jalan Darmawinata Gegerkalong Bandung. Sebelum diberi perlakuan, mencit diaklimatisasi pada suhu ruangan rata-rata 23-29°C, periode ini dilaksanakan selama 7 hari dengan tujuan agar hewan uji teradaptasi dengan kondisi lingkungan yang akan di tempati selama percobaan. Mencit dikelompokkan

dalam kandang berukuran 30 x 20 x 12 cm berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan 4 ekor setiap kandang.

Selama aklimatisasi, mencit diberi pakan standar PC551 dan minum secada *ad libitum*. Botol minum dibersihkan tiap tiga hari sekali dan diganti airnya atau diisi ulang dengan air apabila air telah habis. Aklimatisasi dilakukan untuk meminimalkan factor-faktor yang tidak diinginkan selama penelitian berlangsung.

2. Penentuan Dosis

Dosis jus pinang diberikan berdasarkan pada penelitian sebelumnya, yaitu pemberian arekolin pada sperma manusia secara *in-vitro* sebanyak 100 µg/ml (Er, *et al.* 2005), dengan menggunakan tabel perbandingan luas permukaan tubuh hewan untuk konversi dosis manusia dengan berat badan 70 kg ke mencit dengan berat badan 20 g, didapatkan nilai konversi sebesar 0,0026 (Lauren dan Bacharac, 1964 dalam Sopia, 2009). Dengan demikian penghitungan konversi dosis jus pinang untuk mencit adalah 0,26 µg/ml. Dosis jus pinang kemudian dimodifikasi untuk mencit yaitu sebesar 0 µg/ml (control negative); 0,1 µg/ml; 0,3 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,7 µg/ml; dan 1,0 µg/ml (Er, *et al.* 2005).

3. Pembuatan Jus Pinang

Pembuatan jus pinang diawali dengan memisahkan biji pinang dengan daging buahnya, kemudian biji pinang digerus menggunakan lumping dan alu, lalu menambah aquades sebanyak 100 ml. untuk membuat 100 ml jus pinang dengan konsentrasi 0,3 µg/ml dibutuhkan biji sebanyak 0,004 g. Kebutuhan ini

diperoleh berdasarkan asumsi bahwa dalam setiap gram biji pinang terdapat arekolin sebanyak 7,5 mg (Wang, *et al.* 2008).

Konversi ini dibutuhkan karena dosis yang diberikan pada penelitian sebelumnya menggunakan arekolin murni, sedangkan pada penelitian ini digunakan jus pinang secara langsung. Begitu juga dengan pembuatan jus pinang dengan dosis 0,1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,7 µg/ml; 1,0 µg/ml, menggunakan penghitungan seperti yang telah dijelaskan (Er, *et al.* 2005)

4. Pemberian Jus Pinang

Pemberian jus pinang dilakukan selama 14 hari secara gavage, satu kali dalam sehari dilakukan setiap pagi, tiap mencit dalam kelompok perlakuan diberi jus pinang sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Kapasitas lambung mencit diketahui sebanyak 2 ml maka jus biji pinang yang diberikan adalah sebesar 0,5 ml/hari untuk masing-masing konsentrasi agar lambung mencit dapat menampung jus biji pinang selain pakan yang diberikan.

5. Pengambilan Testis

Mencit yang sudah diberi perlakuan kemudian didekapitasi dan diambil testisnya. Testis yang telah diambil dicuci dengan larutan salin 0,9%. Testis yang telah difiksasi kemudian dicuci aquades kemudian dengan larutan alkohol bertingkat 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, dan 100% selama 3x30 menit.

Pada tahap ini organ terus dikocok.

6. Pembuatan preparat

Pembuatan preparat dilakukan dengan metode paraffin. Testis yang telah dicuci dengan larutan salin kemudian difiksasi dalam larutan formalin 4% selama 24 jam atau lebih. Testis kemudian dicuci dengan aquades 3x30 menit. Kemudian testis didehidrasi dengan direndam dalam alkohol konsentrasi meningkat 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, dan 100% dengan waktu masing-masing 3 x 30 menit selama direndam testis selalu diputar/digoyangkan. Setelah dehidrasi testis dijernihkan/clearing dengan larutan toluol 3 x 30 menit (Hendari *et al*, 1983).

Tahap berikutnya infiltrasi, dengan memasukan testis ke paraffin dengan melting point mulai 48 °C- 50 °C, 50 °C-52 °C, dan 52 °C-55 °C dengan waktu masing-masing 1 jam. Testis kemudian ditanam/embedding pada cetakan paraffin setelah beku testis disayat dengan mikrotom, ketebalan sayatan 4 µm. Pita sayatan ditempelkan pada objek glass berlabel yang sudah diulaskan haups dan ditetesi aquades kemudian di tempatkan pada hot plate sampai aquades kering (Hendari *et al*, 1983).

Pita yang sudah kering kemudian diwarnai dengan metode EHRLICH's Hematoxylin-Eosin. Pita pada objek glass dicelupkan dalam larutan xylol, alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 30% masing-masing selama 3 menit, aquades. Setelah itu direndam dalam pewarna EHRLICH's Hematoxylin selama 3-7 detik lalu dicuci dengan air mengalir sampai warnanya pudar dan kembali dicelupkan dalam alkohol 30%, 50%, 60%, 70% masing-masing selama 3 menit. Pita

diwarnai kembali dengan Eosin 2% selama 1-2 menit lalu dicelupkan dalam alkohol 70%, 80%, 90% dan xylol selama 3 menit. Kemudian pita ditetesi entelan dan ditutup oleh cover glass (Hendari *et al*, 1983).

7. Pengukuran diameter tubulus seminiferus

Diameter Tubulus seminiferus di ukur menggunakan Microfotometer dengan skala 0,01 mm dan mikroskop. Kemudian dilanjutkan pengolahan data untuk mendapatkan nilai rata-rata dari masing-masing konsentrasi menggunakan SPSS.