

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimen, karena pada penelitian ini terdapat manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003).

#### B. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL), dimana terdapat kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Kelompok perlakuan terdiri dari lima kelas. Masing-masing kelas diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak daun Jati belanda sebanyak 0,05 g/bb/hari, 0,1 g/bb/hari, 0,15 gram/bb/hari, 0,20 g/bb/hari, dan 0,25 g/bb/hari serta kelompok kontrol negatif, terdiri dari kelompok mencit yang hanya diberi akuades setiap harinya. Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) diperoleh dari Frederer, 1983 yaitu:

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

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

$$5$$

$$n \geq 4$$

Rina Mardiyah Widyati, 2012  
Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Jati Belanda (*Gauzuma ulmifolia* Lamk) Terhadap Berat Badan, Berat Testis, Dan Jumlah Sperma Mencit (*Mus musculus* L) Galur Swiss Webster

Keterangan: T = jumlah perlakuan

n = jumlah replikasi

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah pengulangan yang dilakukan untuk setiap perlakuan ialah  $n \geq 4$ . Mencit yang digunakan dibagi menjadi lima kelompok perlakuan pemberian ekstrak daun Jati Belanda. Pengacakan dilakukan untuk menghilangkan bias (Sudjana, 2002).

1 D 6	2 F 22	3 C 9	4 B 11	5 D 1	6 E 19
7 E 21	8 F 3	9 A 24	10 C 5	11 A 16	12 B 2
13 B 15	14 F 14	15 E 12	16 E 4	17 B 20	18 D 23
19 F 7	20 D 8	21 A 10	22 A13	23 C 18	24 C 17

**Gambar 3.1.** Hasil Pengocokan Mencit dan Jenis Perlakuan

Keterangan :

A : Kontrol Negatif

B : Diberi ekstrak daun Jati Belanda dengan dosis 0,05 g/bb/hari

C : Diberi ekstrak daun Jati Belanda dengan dosis 0,1 g/bb/hari

D : Diberi ekstrak daun Jati Belanda dengan dosis 0,15 g/bb/hari

E : Diberi ekstrak daun Jati Belanda dengan dosis 0,20 g/bb/hari

F : Diberi ekstrak daun Jati Belanda dengan dosis 0,25 g/bb/hari

1,2,3 dst: Nomor mencit

Berdasarkan gambar 3.1. maka diperoleh peta kandang yang didapatkan sebagai berikut :

**Tabel. 3.1** Peta Kandang Mencit

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

Keterangan :

A : Kontrol Negatif

B : Diberi ekstrak daun Jati Belanda dengan dosis 0,05 g/bb/hari

C : Diberi ekstrak daun Jati Belanda dengan dosis 0,1 g/bb/hari

D : Diberi ekstrak daun Jati Belanda dengan dosis 0,15 g/bb/hari

E : Diberi ekstrak daun Jati Belanda dengan dosis 0,20 g/bb/hari

F : Diberi ekstrak daun Jati Belanda dengan dosis 0,25 g/bb/hari

1,2,3 dst: Nomor Mencit

Sebelum ke tahap perlakuan, seluruh hewan percobaan diaklimatisasi selama tujuh hari. Penimbangan berat badan dilakukan sebelum, selama perlakuan, dan sesudah perlakuan. Masing-masing perlakuan akan diulang sebanyak empat kali. Frekuensi pemberian ekstrak dilakukan sebanyak satu kali setiap harinya pada sore hari. Setelah dua minggu, semua mencit dibedah dan diambil spermanya. Parameter yang akan diamati adalah berat badan, berat testis dan jumlah sperma mencit.

### **C. Populasi dan Sampel**

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

### **D. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Maret hingga Mei 2012. Pembuatan ekstrak daun Jati Belanda dilakukan di laboratorium Fisiologi jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Pemeliharaan mencit dilakukan di kandang hewan jalan Kiaracondong,

Bandung yang sudah terkondisikan. Pengukuran berat badan dilakukan setiap hari selama pemberian perlakuan untuk mendapatkan berat badan awal dan berat badan akhir. Pengukuran berat testis serta jumlah sperma dilakukan di laboratorium Fisiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

### E. Alat dan Bahan

Alat-alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel 1 dan 2 di bawah ini.

**Tabel 3. 2** Alat-alat Penelitian

No.	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
1.	Bak plastik (kandang)	6 Buah	40 x 30 x 12 cm
2.	Tempat minum menci	6 buah	-
3.	Suntikan/ alat <i>gavage</i>	2 buah	Merk Syring/981
4.	Thermometer ruang	1 buah	
5.	Lumpang dan alu	1 buah	-
6.	Pisau bedah	2 buah	Merk B BRAUN
8.	Bak bedah	1 buah	P = 29,5 cm
9.	Jarum pentul	1 bungkus	-
10.	Mikroskop cahaya	2 buah	
11.	Neraca timbangan analitik ( <i>Electrical Balance</i> )	2 buah	Merk AND, HF 300
12.	Timbangan <i>Dial-O-Gram</i>	1 buah	Merk OHAUS
13.	Sarung tangan	3 buah	-

No.	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
14.	<i>Neubauer-Improved</i>	2 buah	Neubauer-Improved 0630010 LoT-No.3309
15.	<i>Tissue</i>	1 buah	Merk Nice
16.	Lap	3 buah	-
17.	Kertas label	1 pak	-
18.	Cawan Petri	3 buah	Normax
19.	<i>Beaker glass 100 ml</i>	2 buah	Schott Duran
20.	<i>Beaker glass 250 ml</i>	1 buah	Pyrex ® Iwaki TE-32
21.	Pipet	4 buah	(Pyrex) Iwaki
22.	<i>Refrigerator</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 Slides Ground Edges dan Deck Glass</i>	20 buah	25.4 x 76.2 mm; 1 mm-1.2 mm thick dan 24 x 24 mm; 0.13 – 0.17 mm

**Tabel 3.3** Bahan – bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Jumlah
1.	Mencit jantan	30 Ekor
2.	Makanan mencit PC 551	20 g
3.	Ekstrak Air Jati Belanda	150 ml
4.	Aquades	10 L
5.	Alkohol 70%	500 ml
6.	NaCl 0,9%	1000 ml
7.	Eosin	100 ml
8.	Minyak emersi	10 L

## **F. Prosedur Penelitian**

### **1. Tahap Persiapan**

#### **a. Pembuatan Kandang Pemeliharaan Mencit dan Aklimatisasi mencit**

Pemeliharaan mencit dilakukan di kandang hewan Jalan Kiara Condong Bandung yang telah dikondisikan. Sebelum diberi perlakuan, mencit diaklimatisasi pada suhu 23-29°C, periode ini dilaksanakan selama 7 hari dengan tujuan agar hewan uji teradaptasi dengan kondisi yang akan ditempati selama percobaan. Mencit dikelompokkan dalam kandang berukuran 40x30x12 cm berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan 4 ekor setiap kandang. Selama aklimatisasi, mencit diberi pakan standar PC 551 dan minum. Botol minuman dibersihkan dan diganti airnya jika kotor atau diisi ulang apabila air telah habis. Aklimatisasi dilakukan untuk meminimalisir faktor-faktor yang tidak diinginkan selama penelitian berlangsung.

#### **b. Pembuatan ekstraksi daun Jati Belanda**

Pembuatan stok ekstrak dilakukan dengan cara melarutkan 1 bagian bubuk daun Jati Belanda ke dalam 10 bagian air. kemudian didiamkan dalam wadah tertutup *aluminium foil* selama 24 jam pada suhu ruangan serta diberi agitasi 60 rpm. Setelah 24 jam, larutan disaring dan residunya diperas. Setelah itu ekstrak cair diuapkan pada suhu 70 °C pada *waterbath* hingga berubah menjadi pasta. Pasta kemudian disimpan dalam wadah tertutup dan dijadikan sebagai stok untuk dijadikan ekstrak.

Untuk masing-masing konsentrasi, dilakukan pengekstrakan dengan cara:

a. 0,05 g/bb/hari

1,0 gram ekstrak dilarutkan dalam aquades hingga 10 ml dan diberikan terhadap mencit sebanyak 0,5 ml.

b. 0,1 g/bb/hari

2,0 gram ekstrak dilarutkan dalam aquades hingga 10 ml dan diberikan terhadap mencit sebanyak 0,5 ml.

c. 0,15 g/bb/hari

3,0 gram ekstrak dilarutkan dalam aquades hingga 10 ml dan diberikan terhadap mencit sebanyak 0,5 ml.

d. 0,20 g/bb/hari

4,0 gram ekstrak dilarutkan dalam aquades hingga 10 ml dan diberikan terhadap mencit sebanyak 0,5 ml.

e. 0,25 g/bb/hari

5,0 gram ekstrak dilarutkan dalam aquades hingga 10 ml dan diberikan terhadap mencit sebanyak 0,5 ml.

f. Kontrol Negatif

Mencit hanya diberi minum *aquades* setiap harinya. Penentuan dosis didasarkan pada penelitian Utomo (2008) yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak sejumlah 6324 mg/bb/hari pada tikus putih tidak menyebabkan kematian. Jika dikonversi pada mencit, maka pemberian 903,5 mg/bb/hari atau setara dengan 0,9 g/bb/hari tidak menyebabkan kematian pada mencit.



## **2. Tahap Perlakuan**

### **a. Aklimatisasi Mencit**

Pemeliharaan hewan dilakukan selama satu minggu di laboratorium pribadi di daerah Kiaracondong, Bandung yang telah dikondisikan. 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 ditempati selama percobaan. Mencit dikelompokkan dalam kandang berukuran 40cm x30cm x12 cm berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan empat ekor setiap kandang.

Selama aklimatisasi, semua kelompok diberi pakan mencit sejumlah 5 gram/ekor, dan minum secara *ad libitum*. Botol minuman dibersihkan tiap tiga hari sekali dan diisi ulang dengan air yang baru apabila air telah habis. Kandang dibersihkan sebanyak 1 minggu sekali. Aklimatisasi dilakukan untuk meminimalkan faktor-faktor yang tidak diinginkan selama penelitian berlangsung.

### **b. Penentuan Dosis**

Dosis yang diberikan pada penelitian ini terdiri dari 0,05 g/bb/hari, 0,1 g/bb/hari, 0,15 g/bb/hari, 0,2 g/bb/hari, dan 0,25 g/bb/hari. Melalui pertimbangan dari penelitian Utomo (2008) yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak alkohol Jati Belanda sejumlah 6314 mg/kg BB tidak memberikan kematian pada tikus. Jika dikonversi pada mencit, maka pemberian 903,5 mg/bb/hari atau setara dengan 0,9 g/bb/hari tidak



menyebabkan kematian pada mencit. Untuk kelompok kontrol negatif tidak diberi perlakuan apapun.

#### **c. Pemberian Ekstrak Daun Jati Belanda**

Pemberian ekstrak daun Jati Belanda dilakukan selama 14 hari secara *gavage*, satu kali dalam sehari. Setiap mencit dalam kelompok perlakuan diberi ekstrak daun Jati Belanda sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Ekstrak air daun Jati Belanda yang diberikan adalah sebesar 0,5 ml/hari untuk masing-masing konsentrasi. Hal ini bertujuan agar lambung mencit dapat menampung ekstrak daun Jati Belanda selain pakan yang diberikan. Selama pemberian ekstrak (2 minggu), mencit diberi pakan standar sebanyak 5 g/ekor dan minum secara *ad libitum*.

#### **d. Pengukuran Berat Badan Mencit**

Pengukuran berat badan dilakukan setiap hari selama aklimatisasi dan selama perlakuan pemberian ekstrak Jati Belanda. Berat badan diukur dengan menggunakan timbangan *Dial-O-Gram* merk OHAUS. Setelah 14 hari pemberian ekstrak Jati Belanda, pada hari ke 14 dihitung selisih dari rata-rata perhitungan berat badan hari pertama dengan rata-rata perhitungan berat badan hari ke-14. Selisih dihitung supaya dapat diketahui kemungkinan adanya peningkatan atau penurunan berat badan pada mencit.

#### e. Pengukuran Berat Testis Mencit

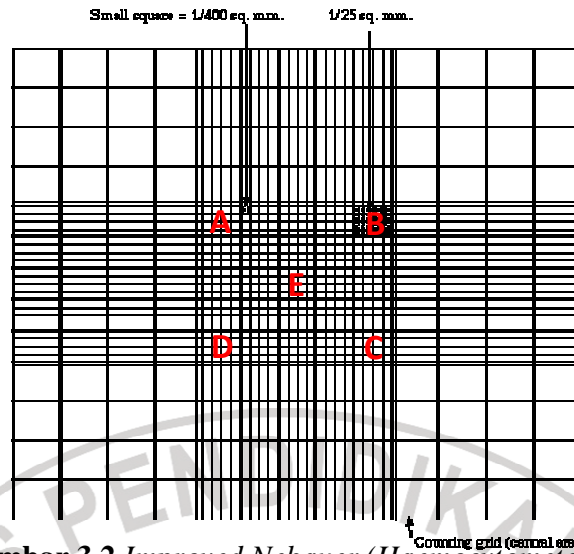
Setelah 14 hari pemberian ekstrak Jati Belanda, pada hari ke 15 dilakukan dislokasi leher mencit, kemudian mencit dibedah dan diambil bagian testisnya. Setelah itu, testis dibersihkan dari lemak yang menempel dalam NaCl 0.9%, lalu testis ditimbang pada neraca timbangan analitik.

#### f. Penghitungan Jumlah Sperma

Hewan uji yang telah diberikan perlakuan selama 14 hari dimatikan dengan cara dislokasi leher kemudian dibedah dan dipisahkan organ reproduksinya kemudian diambil bagian testisnya dan dibersihkan. Penghitungan jumlah sperma dilakukan menurut Soehadi (1983). Mula-mula organ testis beserta *epididimis* yang telah bersih dari lemak disimpan pada NaCl 0.9%, lalu bagian *epididimis* dipisahkan dari organ testis. Setelah itu epididimis dimasukkan ke dalam gelas arloji yang berisi 1 ml NaCl 0.9%, lalu kauda epididimis ditekan dengan perlahan hingga sekresi cairan epididimis keluar dan tersuspensi dengan NaCl 0.9%. Selanjutnya diambil 10 µl suspensi sekresi, lalu ditetaskan ke dalam *Improved Neubauer 33 Haemocytometer* ditutup dengan *cover glass* dan jumlah sperma dihitung pada mikroskop cahaya. Jumlah sperma/ml suspensi sekresi kauda epididimis ditentukan dengan rumus sebagai berikut (Suparni,2009) :

$$\text{Jumlah sperma} = N/2 \times 10^5 \text{ sperma/ml}$$

Keterangan: N=jumlah sperma pada kotak A, B, C, D, dan E (*improved nebauer haemocytometer*).



**Gambar 3.2** Improved Neubauer (Haemocytometer)  
(Sumber: Perez, 2006)

### G. Analisis Data

Data yang telah diperoleh dianalisis secara statistika dengan program SPSS 17 for windows. Tahap awal yang dilakukan adalah uji prasyarat yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan uji homogenitas menggunakan Uji Statistik *Levene*. Data bervariasi homogen dilanjutkan menggunakan statistika parametrik dengan Uji *Anova (Analysis of Variance)* untuk mengetahui perbedaan rata-rata antar perlakuan. Data jumlah sperma dilanjutkan dengan uji *Tukey* karena terdapat perbedaan nyata antar perlakuan. Uji *Tukey* tidak dilakukan terhadap data berat badan dan berat testis karena pada hasil uji *Anova* kedua variabel tidak terdapat perbedaan antar perlakuan.

## H. Alur Penelitian

