

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian berdasarkan kehadiran variabel adalah penelitian eksperimen, dimana variabel yang hendak diteliti (variabel terikat) kehadirannya sengaja ditimbulkan dengan memanipulasi menggunakan perlakuan sesuai dengan kebutuhan (Jannah & Prasetyo, 2005; Purwanto, 2010).

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). Selain itu, bertujuan untuk mengetahui kemungkinan adanya hubungan sebab akibat antar variabel dalam penelitian. Terdapat enam perlakuan yang diberikan pada mencit jantan yakni dosis jus biji pinang. Banyaknya pengulangan atau replikasi didapat dengan menggunakan rumus Federer (1955 dalam Nur, 2010), yaitu :

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

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

$$n \geq 4$$

$$n \geq 4$$

Keterangan: T = jumlah perlakuan = 6

n = jumlah replikasi = 4

Berdasarkan perhitungan tersebut, 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).

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 $\mu\text{g/ml}$;

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

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

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

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

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

(masing-masing diulang empat kali).

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 = 1,0 $\mu\text{g/ml}$	8
		9
		4
		15

Sebelum ke tahap perlakuan, seluruh hewan percobaan diaklimatisasi selama tujuh hari. Penimbangan berat badan dilakukan sebelum dan selama perlakuan. Parameter yang diukur adalah kualitas sperma mencit yang terdiri dari konsentrasi sperma (jumlah sperma/ml semen dari kauda epididimis), motilitas sperma, dan abnormalitas sperma.

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 L.*) jantan galur *Swiss Webster* usia empat bulan.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai bulan Maret sampai dengan Mei 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, sedangkan penghitungan konsentrasi sperma, pemeriksaan motilitas dan abnormalitas sperma mencit dilakukan di Laboratorium Fisiologi Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No.229 Bandung.

E. Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Fisiologi 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 plastik (kandang)	6 Buah	30 x 20 x 12 cm
2.	Tempat minum mencit	6 buah	-

No.	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
3.	Suntikan/ alat gavage	2 buah	Merk Syring/981
4.	Thermometer ruang	1 buah	-
5.	Lumpang dan alu	1 buah	-
6.	Pisau bedah	2 buah	Merk B BRAUN
7.	Gunting bedah	2 buah	Merk Nagoya Japan Stainless C€
8.	Bak bedah	1 buah	P = 29,5 cm
9.	Jarum pentul	1 bungkus	-
10.	Mikroskop cahaya	2 buah	Merk Cosmic
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	-
14.	Neubauer-Improved	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</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>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 Daftar Bahan-bahan Penelitian

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	Mencit jantan	24 ekor
2.	Makanan mencit PC 551	20 kg
3.	Biji pinang	1 buah
4.	Aquades	10 liter
5.	Alkohol 70%	500 ml
6.	NaCl 0,9%	1000 ml
7.	Eosin	100 ml
8.	Minyak emersi	10 ml

F. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian pada penelitian ini adalah:

1. Aklimatisasi Mencit

Pemeliharaan hewan dilakukan di kandang 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 ditempati selama percobaan. Mencit dikelompokkan dalam kandang berukuran 30x20x12 cm berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan empat ekor setiap kandang.

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

2. Penentuan Dosis

Dosis jus biji pinang diberikan berdasarkan pada penelitian sebelumnya, yaitu pemberian arekolin pada sperma manusia secara *in-vitro* sebanyak 100 $\mu\text{g/ml}$ (Er *et al.*, 2006), 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 & Bacharac, 1964 dalam Sopia, 2009). Dengan demikian penghitungan konversi dosis jus pinang untuk mencit adalah 0,26 $\mu\text{g/ml}$. Dosis jus pinang kemudian dimodifikasi untuk mencit yaitu sebesar 0 $\mu\text{g/ml}$ (kontrol negatif); 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,3 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 0,7 $\mu\text{g/ml}$; dan 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

3. Pembuatan Jus Biji Pinang

Pembuatan jus biji pinang diawali dengan memisahkan biji pinang dengan daging buahnya. Kemudian biji pinang digerus menggunakan lumpang dan alu, lalu menambahkan aquades sebanyak 100 ml. Untuk membuat 100 ml jus pinang dengan konsentrasi 0,3 $\mu\text{g/ml}$ dibutuhkan biji pinang 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 biji pinang secara langsung. Begitu juga dengan pembuatan jus pinang dengan dosis 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 0,7 $\mu\text{g/ml}$; 1,0 $\mu\text{g/ml}$, menggunakan penghitungan seperti yang telah dijelaskan.

4. Pemberian Jus Biji Pinang

Pemberian jus biji 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. 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. Penghitungan Konsentrasi Sperma

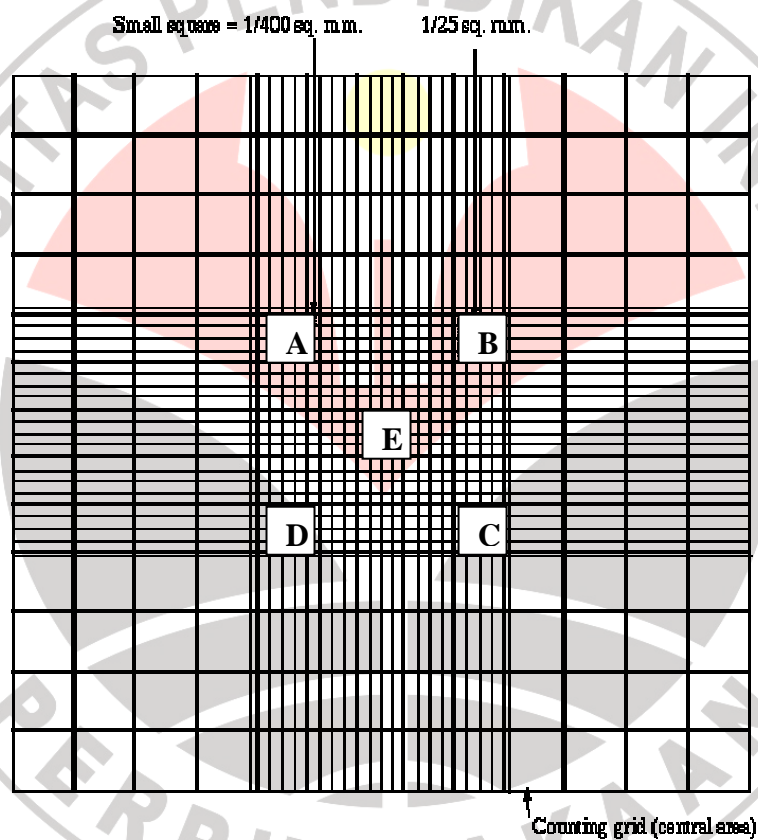
Hewan uji yang telah diberikan perlakuan selama 14 hari dimatikan dengan cara dislokasi leher kemudian dibedah dan dipisahkan organ reproduksinya. Jumlah sperma per ml suspensi semen dari kauda epididimis diamati dengan cara mengambil organ testis beserta epididimis lalu diletakkan di dalam cawan Petri yang berisi NaCl 0,9%, kemudian kauda epididimis dipisahkan dengan cara memotong bagian proksimal korpus epididimis dan bagian distal vas deferens dengan menggunakan mikroskop bedah pada pembesaran 400 kali.

Bagian kauda epididimis yang telah dipotong tersebut dimasukkan ke dalam gelas arloji yang berisi 1 ml NaCl 0,9% untuk dipotong sedikit pada bagian proksimal kauda dengan gunting kemudian menekan kauda dengan perlahan hingga cairan epididimis keluar dan tersuspensi dengan NaCl 0,9%. Suspensi semen sebanyak 10 μ l diambil lalu diteteskan ke dalam *haemocytometer Neubauer* lalu ditutup dengan *cover glass* untuk selanjutnya diamati dan dihitung konsentrasi sperma yang ada di bawah mikroskop cahaya (Soehadi dan Arsyad, 1983).

Menentukan jumlah sperma/ml suspensi semen dari kauda epididimis dengan menggunakan 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 Nebauer (Haemocytometer)*
(Sumber: Perez, 2006)

6. Pengamatan Motilitas Sperma

Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan menghitung persentase (%) spermatozoa yang motil dari sperma pada lima bidang pandang pada *haemocytometer*. Motilitas dari spermatozoa di dalamnya dikelompokkan ke

dalam kriteria A (bergerak maju) dan B (bergerak di tempat) berdasarkan penampakan spermatozoa (Yatim, 1994).

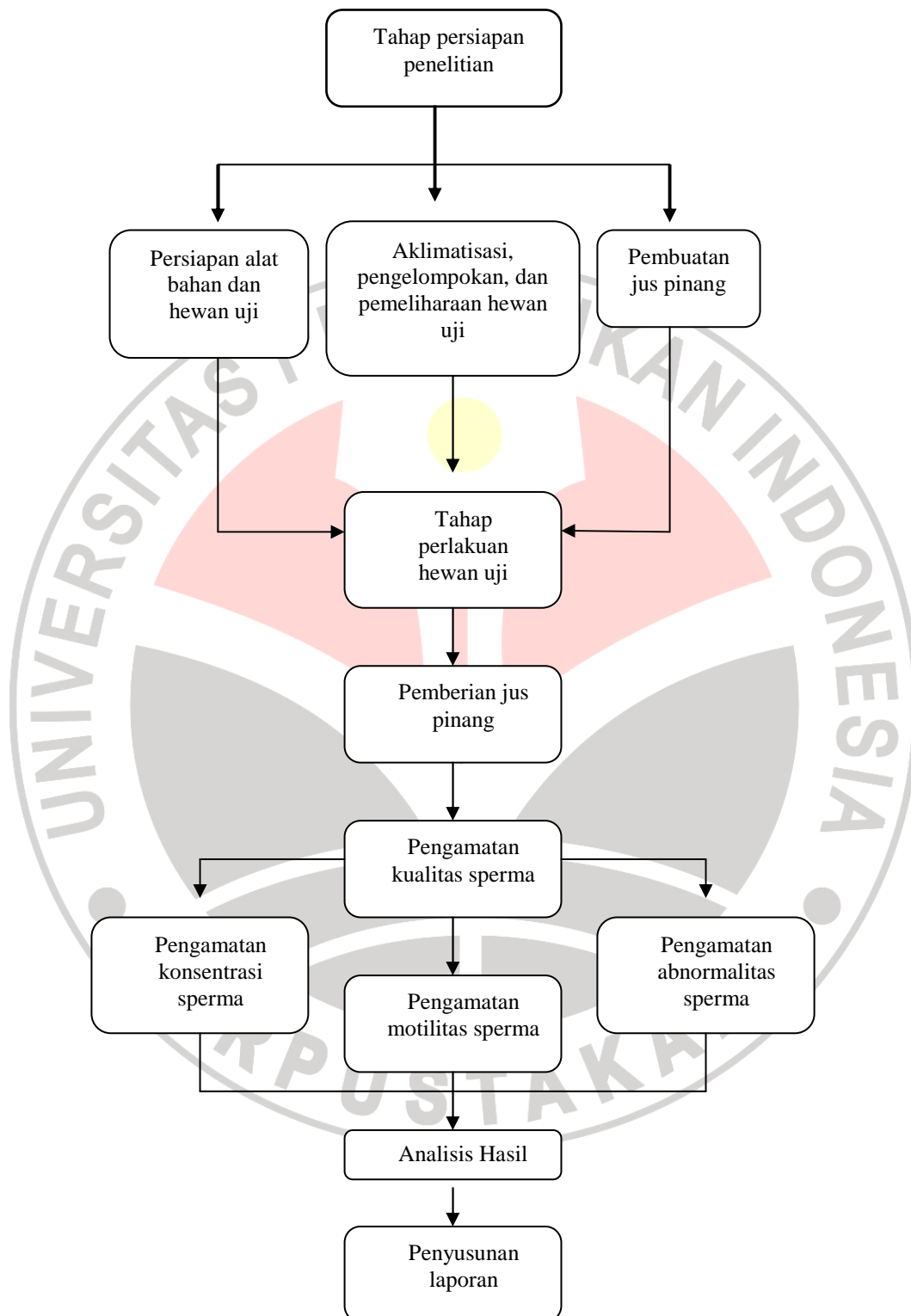
7. Pengamatan Abnormalitas Sperma

Pengamatan abnormalitas sperma dilakukan dengan cara mengamati morfologi sperma dari lima bidang pandang *haemocytometer* pada setiap preparat dengan mikroskop binokuler pada pembesaran 400x, mengamati jumlah spermatozoa abnormal lalu menghitung persentase (%) jumlah sperma abnormal tersebut. Preparat apusan sperma menggunakan pewarna eosin dibuat untuk melihat lebih jelas morfologi sperma yang mengalami abnormalitas. Cairan suspensi sperma yang telah diamati kemudian ditetaskan di atas kaca objek kemudian dismeared menggunakan kaca objek bersih dengan kemiringan 45°, setelah itu didiamkan kering pada suhu ruang kemudian ditetesi dengan pewarna eosin dibiarkan mengering lalu dibilas dengan akuades.

8. Analisis Data

Data yang didapatkan diuji homogenitas dan normalitasnya. Uji normalitas menggunakan uji *Test of Normality (Kolmogorov-Smirnov)* dan uji homogenitas menggunakan *Test of Homogeneity of Variances (Levene Statistic)*. Data yang terdistribusi normal dan bervarian homogen dianalisis secara statistik parametrik yaitu, analisis varian (*ANOVA*). Data yang memiliki perbedaan signifikan untuk setiap perlakuan kemudian diuji lebih lanjut dengan uji wilayah perbandingan berganda *Duncan* (Trihendradi, 2008 dalam Nur, 2010). Analisis data menggunakan *Software SPSS 16 for Windows*.

9. Alur Penelitian



Gambar 3.3 Alur Penelitian