

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang ditempuh ialah jenis penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen merupakan penelitian dimana variabel yang hendak diteliti (variabel terikat) kehadirannya sengaja ditimbulkan dengan memanipulasi menggunakan perlakuan sesuai dengan kebutuhan (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 empat kelas. Yang masing-masing kelas diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak daun Jati belanda dan Ekstrak pinang sebanyak , 0,15 g/BB/hari, 0,25 g/BB/hari, 0,35 g/BB/hari. Serta kelompok kontrol negatif, terdiri dari kelompok mencit yang hanya diberi akuades setiap harinya. Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) diperoleh dari Federer, 1983 yaitu :

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

$$(4 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$3(n - 1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan: T = jumlah perlakuan

n = jumlah replikasi

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah pengulangan yang dilakukan untuk setiap perlakuan ialah $n \geq 6$. Mencit yang digunakan dibagi menjadi empat

Muhammad Ihsanurrozi, 2014

Perbandingan Jumlah Anak Dari Mencit Betina Yang Dikawinkan Dengan Mencit Jantan Yang Mendapat Perlakuan Jus Biji Pinang Muda Dan Jus Daun Jati Belanda

Universitas Pendidikan Indonesia | Repository.Upi.Edu | Perpustakaan.Upi.Edu

kelompok perlakuan pemberian ekstrak daun Jati Belanda dan Ekstrak biji Pinang. Pengacakan dilakukan untuk menghilangkan bias (Sudjana, 2002).

Tabel.3.1. Hasil Pengocokan Mencit dan Jenis Perlakuan

1 D 1	2 A5	3 B 5	4 D5	5 D 6	6 A3
7 C 6	8 C 2	9 A 2	10 D 3	11 B 4	12 A 1
13 B 2	14 C 4	15 D 4	16 C 3	17 D 2	18 C 1
19 C 5	20 B 2	21 B 1	22 A 4	23 A 6	24 B 6

Keterangan :

A : Kontrol Negatif

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

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

D : Diberi ekstrak daun Jati Belanda dengan dosis 0,35 g/bb/hari

1,2,3 dst: Nomor mencit

Berdasarkan Tabel 3.1. maka akan diperoleh penataan mencit berdasarkan nomor mencit yang telah didapatkan dengan cara pengacakan. Adapun peta kandang yang didapatkan sebagai berikut:

Tabel.3.2 Peta Kandang

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

Muhammad Ihsanurrozi, 2014

Perbandingan Jumlah Anak Dari Mencit Betina Yang Dikawinkan Dengan Mencit Jantan Yang

Mendapat Perlakuan Jus Biji Pinang Muda Dan Jus Daun Jati Belanda

Universitas Pendidikan Indonesia | Repository.Upi.Edu | Perpustakaan.Upi.Edu

Keterangan :

A : Kontrol Negatif

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

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

D : Diberi ekstrak daun Jati Belanda dengan dosis 0,35 g/bb/hari

1,2,3 dst: Nomor mencit

Tabel.3.3. Hasil Pengocokan Mencit dan Jenis Perlakuan

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

Keterangan :

A : Kontrol Negatif

B : Diberi ekstrak biji pinang dengan dosis 0,15 g/bb/hari

C : Diberi ekstrak biji pinang dengan dosis 0,25 g/bb/hari

D : Diberi ekstrak biji pinang dengan dosis 0,35 g/bb/hari

1,2,3 dst: Nomor mencit

Berdasarkan Tabel 3.3. maka akan diperoleh penataan mencit berdasarkan nomor mencit yang telah didapatkan dengan cara pengacakan. Adapun peta kandang yang didapatkan sebagai berikut

Tabel.3.4 Peta Kandang

Kandang	Nomor Mencit					
A	5	12	13	14	19	23
B	2	4	6	7	11	20

Muhammad Ihsanurrozi, 2014

Perbandingan Jumlah Anak Dari Mencit Betina Yang Dikawinkan Dengan Mencit Jantan Yang

Mendapat Perlakuan Jus Biji Pinang Muda Dan Jus Daun Jati Belanda

Universitas Pendidikan Indonesia | Repository.Upi.Edu | Perpustakaan.Upi.Edu

C	3	9	15	17	18	22
D	1	8	10	16	21	24

Keterangan :

A : Kontrol Negatif

B : Diberi ekstrak biji pinang dengan dosis 0,15 g/bb/hari

C : Diberi ekstrak biji pinang dengan dosis 0,25 g/bb/hari

D : Diberi ekstrak biji pinang dengan dosis 0,35 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 dan selama perlakuan. Parameter yang diukur adalah jumlah anak yang dihasilkan dari masing perlakuan . Masing-masing perlakuan akan diulang sebanyak lima kali. Frekuensi pemberian ekstrak dilakukan sebanyak satu kali setiap harinya pada pagi hari. Setelah dua minggu, semua mencit dibedah dan diambil spermanya dari dari *cauda epididymis*. Yang akan diamati adalah jumlah sel sperma/ml suspensi sperma, abnormalitas sperma, motilitas sperma, berat testis awal dan berat testis pasca pemberian Ekstrak

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus* L.) jantan dan betina galur *Swiss Webster*. Sedangkan sampel yang digunakan dalam penelitian adalah uterus dan anak mencit

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di kandang mencit di Botani UPI, Bandung. Sedangkan pengambilan sampel akan dilakukan di Laboratorium Fisiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI, Bandung. Penelitian ini dimulai pada bulan Januari sampai Maret 2014 yang akan dilaksanakan di

Muhammad Ihsanurrozi, 2014

Perbandingan Jumlah Anak Dari Mencit Betina Yang Dikawinkan Dengan Mencit Jantan Yang

Mendapat Perlakuan Jus Biji Pinang Muda Dan Jus Daun Jati Belanda

Universitas Pendidikan Indonesia | Repository.Upi.Edu | Perpustakaan.Upi.Edu

kandang mencit pribadi dan Laboratorium Fisiologi Universitas Pendidikan Indonesia.

E. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Fisiologi Universitas Pendidikan Indonesia. Alat-alat yang digunakan selama penelitian ini terdapat pada Tabel.3.5, sedangkan daftar bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdapat pada Tabel 3.6.

Tabel 3.5. Alat – alat Penelitian

No.	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
1.	Bak plastik (kandang)	6 buah	40 x 30 x 12 cm
2.	Tempat minum mencit	6 buah	-
3.	Suntikan/ alat gavage	2 buah	Merk Syring/981
4.	Thermometer ruang	1 buah	Merk
5.	Evaporator	1 buah	-
6.	Pisau bedah	2 buah	Merk B BRAUN
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	Merk
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

Muhammad Ihsanurrozi, 2014

Perbandingan Jumlah Anak Dari Mencit Betina Yang Dikawinkan Dengan Mencit Jantan Yang

Mendapat Perlakuan Jus Biji Pinang Muda Dan Jus Daun Jati Belanda

Universitas Pendidikan Indonesia | Repository.Upi.Edu | Perpustakaan.Upi.Edu

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 3.6. Daftar Bahan-bahan Penelitian

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	Mencit jantan dan Mencit Betina Dara	Masing- masing 30 ekor
2.	Makanan mencit	10 kg
3.	Daun Jati Belanda Kering	200 gram
4.	Biji Pinang	
	Aquades	10 liter
5.	Alkohol 70%	500 ml
6.	NaCl 0,9%	1000 ml
7.	Eosin	100 ml
8.	Minyak emersi	100 ml
9.	Pakan berlemak	3 kg

F. Tahap Penelitian

Muhammad Ihsanurrozi, 2014

Perbandingan Jumlah Anak Dari Mencit Betina Yang Dikawinkan Dengan Mencit Jantan Yang Mendapat Perlakuan Jus Biji Pinang Muda Dan Jus Daun Jati Belanda

Universitas Pendidikan Indonesia | Repository.Upi.Edu | Perpustakaan.Upi.Edu

Prosedur penelitian pada penelitian ini meliputi tahap persiapan dan tahap penelitian. Berikut ialah perinciannya :

1. Aklimatisasi Mencit

Pemeliharaan hewan dilakukan selama satu minggu di laboratorium pribadi di daerah Kiaracondong, 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 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.

2. Penentuan Dosis

Dosis yang diberikan pada penelitian ini terdiri dari 0,00 g/BB/hari (kontrol); 0,15 g/BB/hari; 0,25 g/BB/hari; dan 0,35 g/BB/hari. Hal tersebut didasarkan pada pertimbangan dari penelitian Utomo (2008) yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak alkohol daun Jati Belanda sejumlah 6324 mg/kg BB tidak memberikan kematian pada tikus putih. Selain itu dalam penelitian Adjirni *et al.* (2001) yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak air daun Jati Belanda sampai 941 mg/kg BB atau setara dengan 0,94 g/kg BB (100 kali dosis normal) tidak memberikan kematian pada mencit, sehingga dapat dikatakan bahwa jus daun Jati Belanda merupakan bahan yang aman digunakan dalam pengobatan. Penelitian dari Rahardjo *et al.* (2006) juga menyatakan bahwa dosis 100-350 mg/BB/hari merupakan dosis aman untuk digunakan pada hewan uji. Diambilnya *range* antara

Muhammad Ihsanurrozi, 2014

Perbandingan Jumlah Anak Dari Mencit Betina Yang Dikawinkan Dengan Mencit Jantan Yang

Mendapat Perlakuan Jus Biji Pinang Muda Dan Jus Daun Jati Belanda

Universitas Pendidikan Indonesia | Repository.Upi.Edu | Perpustakaan.Upi.Edu

0,15 g/BB/hari hingga 0,35 g/BB/hari didasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yulianty (2012), dengan hasil yang paling berpengaruh terhadap kualitas sperma didapat pada dosis tertinggi yakni 0,25 g/BB/hari dari kelima dosis perlakuan (0,05 g/BB/hari; 0,10 g/BB/hari; 0,15 g/BB/hari; 0,20 g/BB/hari; 0,25 g/BB/hari). *Range* 0,15 g/BB/hari hingga 0,35 g/BB/hari merupakan dosis aman penggunaan jus daun Jati Belanda, sedangkan dosis lethal sendiri berjumlah 1,34 gram/BB/hari (Adjirni *et al.*, 2001). Pada penelitian Aulanni'am *et al.* (2007) dan Akmal *et al.* (2010), hasil menunjukkan bahwa pemberian ekstrak air biji pinang sejumlah 4 g/200 g BB/hari tidak memberikan kematian pada tikus putih atau setara dengan 0,56 g/BB/hari pada hewan uji mencit.

3. Pembuatan Kandang Pemeliharaan Mencit

Kandang mencit terbuat dari bak plastik berukuran 40 cm x 30 cm x 12 cm. Bak plastik diberi medium tempat hidup mencit berupa serutan kayu. Bagian atas bak diberi ram kawat untuk mencegah mencit keluar dari kandang. Kandang diberi tempat minum mencit sebanyak satu buah per kandang (Utami, 2010).

4. Pengumpulan Bahan dan Pembuatan Ekstrak Jati Belanda

Bubuk daun Jati Belanda dikumpulkan dari pemasok obat herbal Cina di daerah Pasar Baru, Bandung. Kemudian dilakukan ekstraksi dengan cara *hydrolitic maseration* atau maserasi hidrolisis. Yakni maserasi dengan menggunakan air sebagai pelarut bahan yang diekstraksi (Tandon, 2008).

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.

Muhammad Ihsanurrozi, 2014

Perbandingan Jumlah Anak Dari Mencit Betina Yang Dikawinkan Dengan Mencit Jantan Yang

Mendapat Perlakuan Jus Biji Pinang Muda Dan Jus Daun Jati Belanda

Universitas Pendidikan Indonesia | Repository.Upi.Edu | Perpustakaan.Upi.Edu

Pasta kemudian disimpan dalam wadah tertutup dan dijadikan sebagai stok untuk dijadikan ekstrak (Indriani, 2006).

Untuk masing-masing konsentrasi, dilakukan pengekstrakan dengan cara:

- a. 0,15 g /bb/hari
1,0 gram ekstrak dilarutkan dalam aquades hingga 10 ml
- b. 0,25 g/bb/hari
2,0gram ekstrak di larutkan dalam aquades hingga 10 ml
- c. 0,35 g/bb/hari
3gram ekstrak dilarutkan dalam aquades hingga 10 ml
- d. Kontrol negatif

Mencit hanya diberi minum aquades setiap hari nya

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.

5. Pengumpulan Bahan dan Pembuatan Ekstrak biji Pinang muda

Biji pinang diperoleh langsung dari pohon pinang yang ditanam di FPMIPA UPI, Bandung. Biji pinang yang digunakan adalah biji pinang muda yang kulitnya berwarna hijau. Biji pinang yang dipilih harus dalam keadaan baik (tidak busuk dan tidak berjamur). Cara pembuatan jus biji pinang adalah sebagai berikut: pinang dikupas, lalu diambil bijinya dan dihancurkan dengan martil, kemudian dijemur sampai kering. Biji pinang yang sudah kering ditimbang sebanyak 30 gram dan ditambahkan aquades sebanyak 200 ml. Selanjutnya dipanaskan hingga tersisa 100 ml jus biji pinang, sehingga setiap 1 ml mengandung 0,3 gram ekstrak biji pinang, kemudian diberikan sebanyak 0,5 ml/hari/ekor mencit. Perhitungan tersebut adalah untuk dosis 0,15 g/BB/hari. Begitu juga dengan pembuatan jus

Muhammad Ihsanurrozi, 2014

Perbandingan Jumlah Anak Dari Mencit Betina Yang Dikawinkan Dengan Mencit Jantan Yang

Mendapat Perlakuan Jus Biji Pinang Muda Dan Jus Daun Jati Belanda

Universitas Pendidikan Indonesia | Repository.Upi.Edu | Perpustakaan.Upi.Edu

pinang dengan dosis 0,25 g/BB/hari dan 0,35 g/BB/hari menggunakan penghitungan seperti yang telah dijelaskan (Aulanni'am *et al.*, 2007).

Untuk masing-masing dosis, dilakukan pembuatan jus biji pinang muda dengan cara:

- 1) 0,15 g/BB/hari
30 gram biji pinang ditambahkan aquades 200 ml dan dipanaskan hingga tersisa 100 ml, kemudian diberikan sebanyak 0,5 ml/hari/ekor mencit.
- 2) 0,25 g/BB/hari
50 gram biji pinang ditambahkan aquades 200 ml dan dipanaskan hingga tersisa 100 ml, kemudian diberikan sebanyak 0,5 ml/hari/ekor mencit.
- 3) 0,35 g/BB/hari
70 gram biji pinang ditambahkan aquades 200 ml dan dipanaskan hingga tersisa 100 ml, kemudian diberikan sebanyak 0,5 ml/hari/ekor mencit.
- 4) 0,00 g/BB/hari (kontrol)
Terdiri dari aquades tanpa jus biji pinang muda.

6. Pemeriksaan Fase Estrus Pada Mencit

Pemeriksaan Fase Estrus pada mencit betina dilakukan dengan cara membuat preparat apusan vagina. Pertama ambil seekor mencit betina, kemudian pegang dengan tangan kiri, ibu jari dan telunjuk jari memegang tengkuknya atau leher dorsalis. Dengan jari tengah, jari manis, dan kelingking memegang badan ekor. Bagian vagina disemprotkan NaCl 0,9% menggunakan pipet yang tumpul, kemudian dihisap sampai 3 sampai 4 kali dengan hati-hati dan perlahan. Cairan pada pipets dari hasil penyemprotan/pengisapan kemudian diteteskan ke gelas objek 1-2 tetes. Biarkan hingga kering dan tetesi dengan larutan pewarna eosin 1% . Biarkan 5 sampai 10 menit, bilas dengan aquadest. Tutup dengan glass penutup dan amati dibawah mikroskop. Pada fase estrus ini ditandai dengan

Muhammad Ihsanurrozi, 2014

Perbandingan Jumlah Anak Dari Mencit Betina Yang Dikawinkan Dengan Mencit Jantan Yang

Mendapat Perlakuan Jus Biji Pinang Muda Dan Jus Daun Jati Belanda

Universitas Pendidikan Indonesia | Repository.Upi.Edu | Perpustakaan.Upi.Edu

adanya sel kornifikasi atau sel epitel menanduk yang sangat banyak. Sel epitel dengan inti berdegenerasi.

7. Pengawinan Mencit Jantan Yang Telah Diberi Perlakuan Dengan Mencit Betina Dara

Pengawinan dilakukan pada mencit jantan yang telah diberi perlakuan dengan mencit betina yang sedang pada masa estrus. Satu ekor mencit jantan dari setiap dosis perlakuan ditempatkan dengan satu mencit betina yang sedang dalam masa estrus. Mencit betina diperiksa setiap harinya untuk menentukan kebuntingannya. Adanya sumbat vagina menandai telah terjadinya kopulasi dan dihitung sebagai umur kebuntingan 0 (H-0). Masa kebuntingan mencit berkisar selama 19- 21 hari.

8. Jumlah Anak Mencit Yang Lahir

Penghitungan jumlah anak mencit dilakukan berdasarkan berapa jumlah anak mencit yang dilahirkan oleh induk betina mencit yang sebelumnya dikawinkan dengan induk jantan yang di beri perlakuan. H-0 kebuntingan ditetapkan pada saat sudah terjadinya kopulasi antara mencit jantan dan mencit betina yang dapat dilihat dengan adanya sumbat vagina serta terdapatnya sperma pada apusan vagina mencit betina. Masa kebuntingan mencit betina berkisar selama 19-21 hari.

9. Jumlah Titik Implantasi

Penghitungan jumlah titik implantasi dilakukan dengan cara membedah mencit, memisahkan organ uterusnya. Organ uterus yang telah dipidahkan diberi larutan NaCl 0,9% kemudian di tetesi larutan Kalium Permanganat sebagai zat pewarna untuk memudahkan menghitung titik implantasi yang ada. Pembedahan dilakukan setelah mencit betina melahirkan. Untuk mencit yang tidak mengalami kelahiran di bedah pada hari ke 21 pasca terjadinya kopulasi.

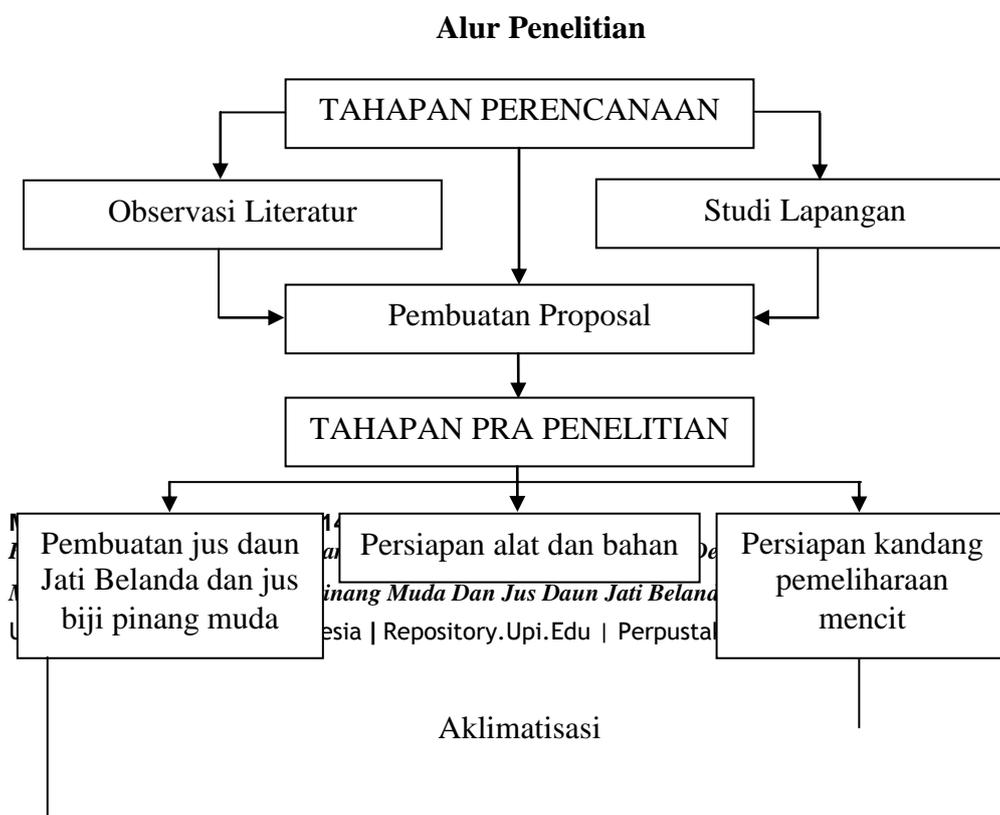
Muhammad Ihsanurrozi, 2014

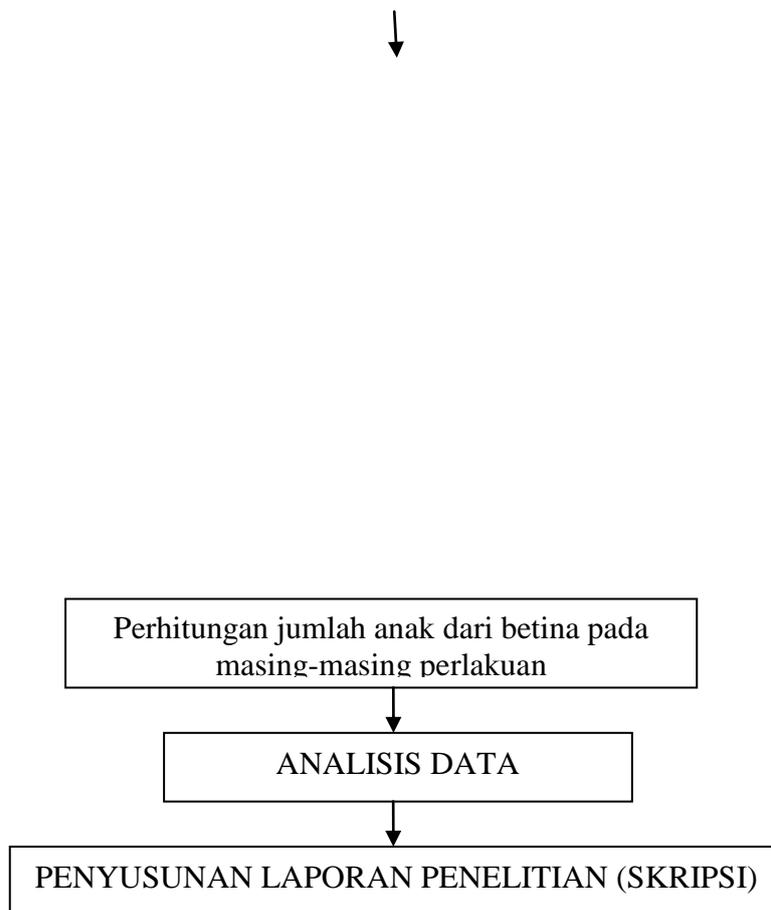
Perbandingan Jumlah Anak Dari Mencit Betina Yang Dikawinkan Dengan Mencit Jantan Yang Mendapat Perlakuan Jus Biji Pinang Muda Dan Jus Daun Jati Belanda

Universitas Pendidikan Indonesia | Repository.Upi.Edu | Perpustakaan.Upi.Edu

10. 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 berdistribusi normal dan bervarian homogen dianalisis secara statistik parametrik yaitu, analisis varian (*Two-Way ANOVA*). Data yang memiliki perbedaan signifikan untuk setiap perlakuan kemudian diuji lebih lanjut dengan uji wilayah perbandingan berganda *Tukey HSD^a*. Data yang tidak berbeda signifikan tidak diuji lebih lanjut dengan uji *Tukey HSD^a*. Analisis data menggunakan *Software SPSS 20 for Windows*





Gambar 3.1. Alur Penelitian