

BAB III

METODE PENELITIAN

a. Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini termasuk ke dalam jenis penelitian Eksperimental. Penelitian eksperimental adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003). Menurut Sugiyono (2009), penelitian eksperimental adalah penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap hal lain yang dalam kondisi yang terkendalikan. Sedangkan menurut Arikunto (2006) mengatakan bahwa, penelitian eksperimental adalah suatu cara untuk mencari hubungan sebab-akibat antara dua faktor yang sengaja ditimbulkan oleh peneliti dengan mengeliminasi atau mengurangi atau menyisihkan faktor-faktor lain yang mengganggu. Hal ini sesuai dengan yang dilakukan karena penelitian ini mengungkapkan ada atau tidaknya pengaruh dari variabel yang dipilih untuk dijadikan penelitian, singkatnya mencari pengaruh akan variabel-variabelnya. Adapun yang menjadi objek penelitian adalah pengaruh ekstrak daun Ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap aspek reproduksi mencit (*Mus musculus*) Balb/C jantan.

b. Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk menguji bagaimana pengaruh ekstrak daun Ciplukan terhadap aspek reproduksi mencit Balb/C jantan. Mencit ini di diberikan ekstrak daun secara oral kepada empat kelompok hewan uji dengan dosis yang berbeda-beda selama 30 hari. Kemudian setelah diberikan ekstrak daun ciplukan secara oral, dilakukan pengujian pada organ reproduksi, yakni testis dan kauda epididimis. Testis diukur bobot, diameter dan ketebalan sel germinal untuk mengetahui adanya perubahan sel spermatogenik. Sedangkan kauda edidimis diamati motilitas, jumlah sperma, dan abnormalitas spermanya.

Setelah data di dapatkan, maka data dianalisis dengan menggunakan uji *ANOVA pada SPSS 22 for Windows*

c. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) Balb/C jantan. Sampel penelitian ini adalah mencit jantan yang dipelihara di Rumah Mencit Laboratorium Kebun Botani UPI dengan umur 4 – 6 minggu dengan sebanyak 24 ekor. Adapun besar sampel keseluruhan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus (Federer, 1991) sebagai berikut:

$$\begin{array}{rcl} (n-1)(t-1) & \geq & 15 \\ (n-1)(4-1) & \geq & 15 \\ 3n-3 & \geq & 15 \\ 3n & \geq & 18 \\ N & \geq & 6 \end{array}$$

Keterangan:

t : Jumlah kelompok uji
n : Besar sampel per kelompok

Besar sampel ideal menurut hitungan rumus Federer diatas adalah 6 ekor mencit atau lebih. Dengan demikian jumlah mencit jantan untuk semua kelompok uji secara keseluruhan adalah minimal 24 ekor. Dimana 24 ekor mencit tersebut dibagi kedalam 4 kelompok uji, yang masing-masing kelompok uji terdiri dari 6 ekor mencit.

d. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), Penelitian ini dilakukan dengan cara memberikan ekstrak daun Ciplukan (*Physalis angulata L.*) kepada mencit (*Mus musculus*) secara oral menggunakan *sonde lambung/gavage*. Kelompok perlakuan terdiri dari 3 kelompok yang masing-masing kelompok diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak daun Ciplukan (*Physalis angulata L.*) dengan dosis 250 mg/Kg bb, 300 mg/Kg bb, atau 350 mg/Kg bb. Selain itu, terdapat pula kelompok kontrol yang terdiri dari kelompok mencit yang tidak diberi ekstrak daun Ciplukan (*Physalis angulata L.*) setiap harinya. Setelah itu, dilakukan *randomisasi* untuk pengelompokan. Tabel 3.1. adalah tabel yang berisi bagan pengelompokan dengan kode 1-24 pada mencit yang akan menempati kandang yang telah diberi kode A, B, C, D :

Tabel 3.1 Kode Pengelompokan Mencit Jantan

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

Keterangan:

- A : Dosis 0mg/kg bb/hari (Kontrol)
 B : Dosis 250mg/kg bb/hari
 C : Dosis 300mg/kg bb/hari
 D : Dosis 350mg/kg bb/hari
 1,2,3, dst: Nomer atau Kode Mencit

Sedangkan Tabel 3.2. adalah hasil dari pembagian kelompok hewan uji berdasarkan perlakuan, dosis, dan organ yang akan diuji:

Tabel 3.2 Pembagian kelompok hewan uji

Kelompok	Jumlah Mencit (ekor)	Dosis	Perlakuan	Lama Perlakuan	Organ yang diuji
I	6	0mg/kg bb/hari	Tidak diberi Ekstrak daun Ciplukan, makan dan minum <i>ad libitum</i>	30 hari	Kauda epididimis dan Testis
II	6	250mg/kg bb/hari	Diberi ekstrak daun Ciplukan dengan dosis 250mg/kg bb/hari, sebanyak dua kali sehari	30 hari	Kauda epididimis dan Testis
III	6	300mg/kg bb/hari	Diberi ekstrak daun Ciplukan dengan dosis 300mg/kg bb/hari, sebanyak dua kali sehari	30 hari	Kauda epididimis dan Testis

IV	6	350mg/kg bb/hari	Diberi ekstrak daun Ciplukan dengan dosis 350mg/kg bb/hari, sebanyak dua kali sehari	30 hari	Kauda epididimis dan Testis
----	---	---------------------	--	---------	-----------------------------

e. Waktu dan Lokasi Penelitian

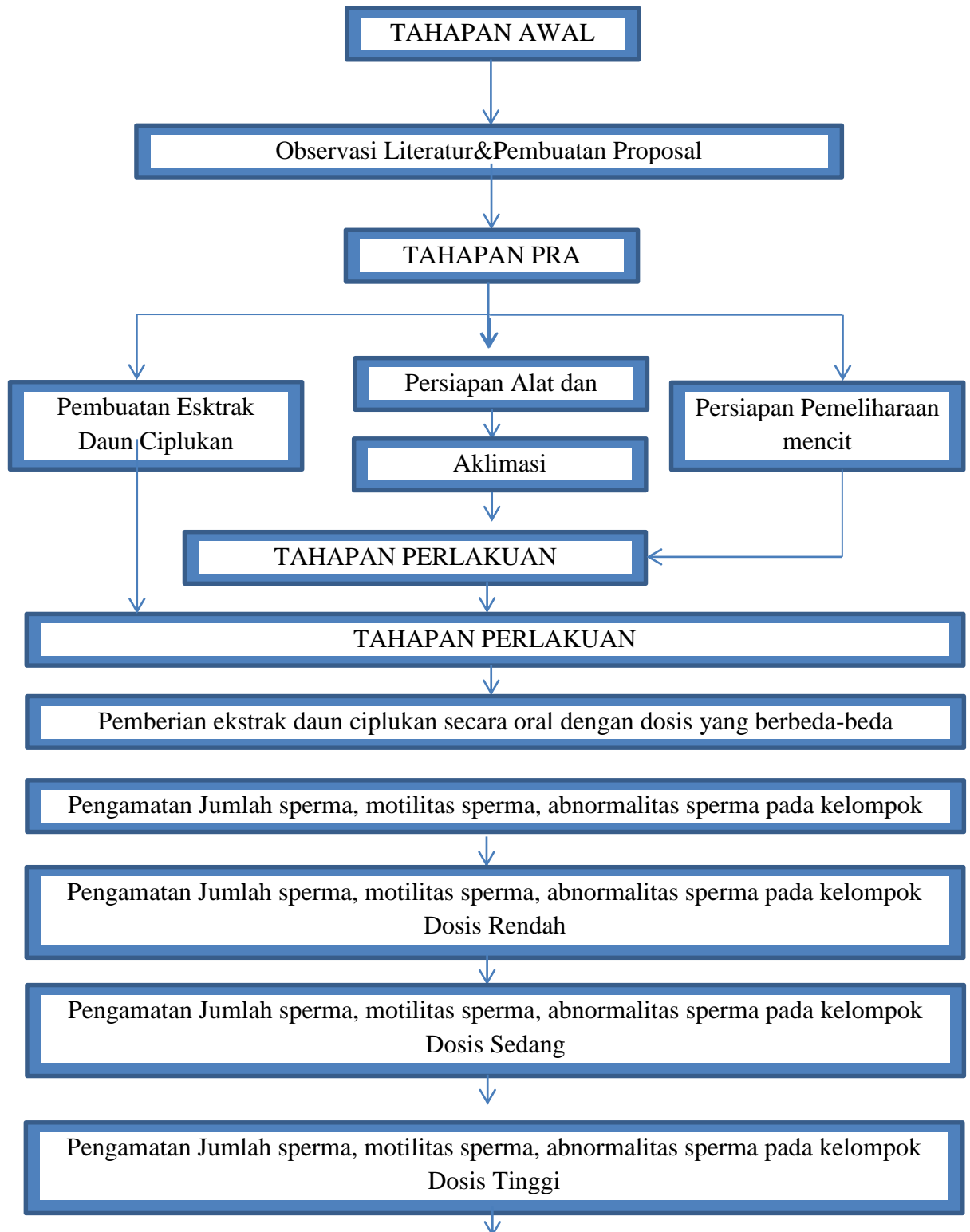
Penelitian mulai dilaksanakan dari bulan Januari hingga Mei 2017 di Rumah Mencit sebagai tempat pemeliharaan dan pemberian perlakuan hewan uji, Laboratorium Riset dan Bioteknologi sebagai tempat pembuatan ekstrak daun, pengamatan aspek reproduksi mencit, pembedahan dan pembuatan preparat histologi testis, dan Laboratorium Struktur Hewan untuk proses infiltrasi preparat, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.

f. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan, tempat minum hewan, sonde lambung, *Syringe*, alat bedah minor, timbangan analitik, gelas ukur berbagai ukuran (Pyrex), *petri disc* (Pyrex), Kaca arloji, Haemocytometer *Improved nebauer* (NESCO), lensa Okuler, *Stage micrometer*, kaca objek, kaca penutup, mikropipet (Effendorf) 1000 μ L, mikrotom, *coplin jar*, dan mikroskop binokuler. Sedangkan alat penunjang lainnya adalah alat dokumentasi, dan alat tulis.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah Mencit (*Mus musculus*) galur Balb/C jantan yang berumur 4-6 minggu diperoleh dari Laboratorium Hewan Biofarma Lembang, ekstrak daun Ciplukan (*Physalis angulata*) yang diperoleh dari daerah Tasikmalaya. Sedangkan bahan penunjang adalah pakan mencit, *aquadest*, NaCl fisiologis 0,9%, *Phosphate Buffer Saline*, larutan Eosin Y 1%, Formalin 4%, Alkohol dengan berbagai konsentrasi (60%-70%-80%-90%-96%-100%), xylol, entelan, kapas, dan tissue. Daftar alat dan bahan yang digunakan selama penelitian selengkapnya terdapat pada Lampiran 2

g. Alur Penelitian



h. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan Hewan Uji Coba

Hewan yang digunakan adalah 24 ekor mencit (*Mus musculus*) Balb/C jantan dengan berat sekitar (30-50 gr). Mencit ini didapat pertama kali dari Biofarma Lembang, dengan umur 4-6 minggu. Sebelum masuk ke dalam tahap perlakuan, hewan percobaan diaklimatisasi selama 1 minggu. Penimbangan berat badan dilakukan selama aklimatisasi dan selama perlakuan. 24 ekor mencit (*Mus musculus*) ini dipelihara dalam 4 kandang yang terbuat dari bak plastik berukuran 28 cm x 30 cm x 12 cm dengan ditutupi kawat pada bagian atas yang dipelihara di rumah hewan, berisi medium berupa serutan kayu, dan masing-masing kandang berisi 6 ekor. Keadaan selama aklimatisasi dan perlakuan dikontrol pada kisaran lingkungan yang tetap dengan tujuan agar hewan uji beradaptasi dengan kondisi yang akan ditempati selama percobaan. Selama percobaan suhu ruangan berkisar antara 21⁰C- 25⁰C. Makanan yang diberikan berupa pelet dan minum berupa air matang dengan cara *ad libitum*. Pencahayaan dilakukan selama 12 jam/hari dari pukul 06.00 WIB hingga 18.00 WIB.

2. Tahap Persiapan Ekstrak Daun Ciplukan

Pengambilan sampel daun ciplukan dilakukan dari tanaman dengan sumber yang sama, daun tanaman tersebut dicuplik dan di seleksi agar daun yang didapatkan adalah daun yang segar dan tidak terserang penyakit. Pastikan sumber sampel tanaman yang dicuplik adalah benar. Pengambilan ekstrak daun dilakukan dengan ekstraksi air, yang merupakan modifikasi dari metode Halim *et al.*, (2012). Hal ini dilakukan karena dengan pelarut air biasa dilakukan oleh masyarakat luas. Proses pembuatan ekstrak diawali dengan proses pembuatan serbuk. Pertama-tama daun yang telah dicuplik dikeringkan sampai benar-benar kering dan diblender hingga halus atau membentuk serbuk. Setelah bubuk kemudian dilakukan penimbangan sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Ekstrak yang sudah ditimbang dimasukkan kedalam plastik

zipper dan dilarutkan dengan air. Kegiatan ini dilakukan di Laboratorium Riset dan Bioteknologi FPMIPA UPI.

3. Penentuan Dosis

Penentuan dosis dan pemberian ekstrak daun ciplukan menggunakan 3 dosis. Penentuan dosis ini didasarkan pada artikel penelitian yang dilakukan oleh (Naser *et al.*, 2008). Pemberian dosis ekstrak daun ciplukan dilakukan secara oral menggunakan sonde lambung kepada 4 kelompok uji:

- a. Kelompok I adalah kelompok kontrol netral yang tidak diberikan perlakuan apapun.
- b. Kelompok II adalah kelompok hewan yang diberikan ekstrak daun ciplukan dengan dosis 250mg/kg/hari.
- c. Kelompok III adalah kelompok hewan yang diberikan ekstrak daun ciplukan dengan dosis 300mg/kg/hari.
- d. Kelompok IV adalah kelompok hewan yang diberikan ekstrak daun ciplukan dengan dosis 350mg/kg/hari

4. Tahap Pemberian Ekstrak Daun Ciplukan (*Physalis angulata*)

Pemberian ekstrak daun Ciplukan ini dilakukan selama 30 – 35,55 hari sesuai dengan siklus spermatogenesis mencit (Rugh, 1968), secara oral menggunakan sonde lambung. Ekstrak diberikan pada mencit dengan dosis yang berbeda-beda pada setiap kelompoknya sesuai dengan berat badan mencit, dengan salah satu kelompok lainnya hanya menerima *aquadest* saja tanpa ekstrak daun Ciplukan. Ekstrak yang diberikan sebelumnya disuspensikan terlebih dahulu dengan menggunakan pelarut *aquadest*, yang disesuaikan dengan volume maksimal lambung mencit.

Pemberian ekstrak ini juga diberikan sebanyak dua hari satu kali setiap pagi hari sebelum diberikan pakan, dengan disesuaikan pada waktu paruh yang merujuk pada artikel penelitian (Beasley, 1999) yang menyatakan bahwa waktu paruh untuk tanaman sejenis *Physalis* memerlukan waktu selama 6jam – 3 hari lamanya. Penyesuaian waktu

paruh sendiri adalah untuk menghindari terakumulasinya ekstrak daun Ciplukan dalam tubuh mencit agar terhindar dari kematian.

5. Tahap Analisis Aspek Reproduksi

a. Perhitungan Bobot Testis

Setelah masa pemberian ekstrak tersebut berakhir, maka hal yang dilakukan pertama kali adalah dilakukannya bedah pada mencit untuk diambil bagian organ reproduksinya yaitu testis. Testis diambil karena bertujuan untuk diukur bobotnya dan nantinya akan dibuat sayatan histologi. Pengukuran bobot testis dilakukan dengan menimbang kedua testis pada timbangan analitik yang terdapat di laboratorium untuk dibandingkan bobotnya dengan bobot testis yang diberi perlakuan dan kontrol. Setelah bobot testis dihitung, organ testis dimasukan ke dalam botol plastik yang berisi larutan formalin 4% untuk diawetkan dan dibuat preparat histologi. Hasil dari penimbangan bobot organ tadi akan diolah menggunakan uji statistik untuk melihat signifikansinya.

b. Tahap Pembuatan Suspensi sperma

Setelah pengukuran bobot testis selesai dilakukan, langkah selanjutnya adalah pembuatan suspensi sperma untuk dilakukan pengamatan motilitas sperma dan perhitungan konsentrasi sperma. Langkah awal yang dilakukan adalah pastikan alat dan bahan untuk pembuatan suspensi telah disediakan, seperti larutan NaCl 0.9% sebanyak 500 µl yang telah ditempatkan pada *petri disc* atau kaca arloji, kemudian bunsen yang sudah dinyalakan untuk menjaga suhu NaCl tetap hangat. Mikropipet berbagai ukuran, juga peralatan lainnya.

Pertama-tama bagian kauda epididimis dipisahkan dari organ reproduksi mencit, kemudian ditempatkan pada kaca arloji yang sudah berisi 500 µl NaCl 0.9%, kemudian spermatozoa dikeluarkan dengan cara memotong bagian kauda epididimis dengan

menggunakan *scalpel* dan dilakukan penekanan secara perlahan hingga cairan semen keluar dan tersuspensi. Kemudian, suspensi dihomogenkan dengan menggunakan mikropipet hingga spermatozoa tersuspensi dengan baik.

c. Perhitungan Motilitas Sperma

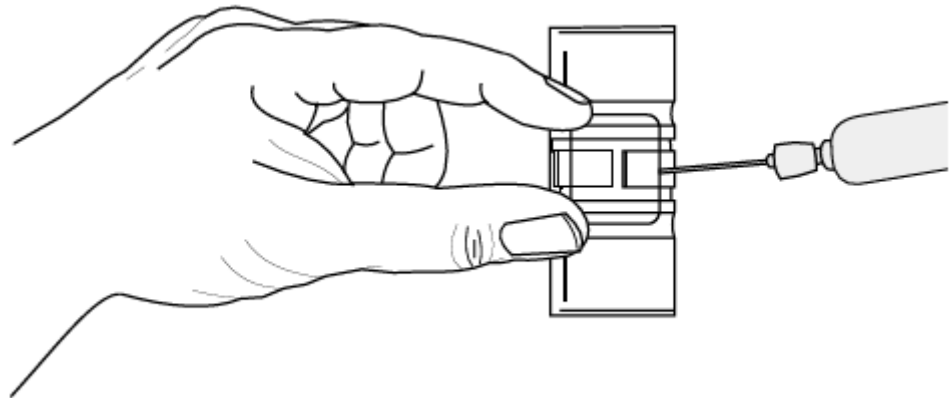
Setelah mendapatkan suspensi sperma, suspensi tersebut diambil sebanyak 5-10 μ l lalu diteteskan pada kaca objek dan dilakukan pengamatan dengan bantuan mikroskop. Motilitas sperma ditentukan atau dinilai berdasarkan kriterianya seperti bergerak aktif, zigzag, lincah, atau hanya diam saja. Kemudian hasilnya dicatat dalam tabel pengamatan. Berikut adalah metode penilaian motilitas sperma menurut Soeharno (1987 dalam Fitria, 2011) sebagai berikut:

- a. *Grade 0* : Spermatozoa tidak bergerak sama sekali.
- b. *Grade 1* : Spermatozoa bergerak sangat lambat/ bergerak sedikit sekali.
- c. *Grade 2* : Spermatozoa bergerak ke depan dengan kecepatan sedang/bergerak zigzag dan berputar putar.
- d. *Grade 3* : spermatozoa bergerak ke depan atau lurus seperti roket.

Penilaian motilitas sperma ditentukan dari 5-10 μ l suspensi spermatozoa atau dari 50 spermatozoa yang teramati pada mikroskop guna mengurangi data bias. Setelah mendapatkan hasil penilaian pergerakan sperma, maka dilakukan perhitungan persentase (%) spermatozoa yang motil dan imotil dengan metode (WHO, 2010) dimana kelas A merupakan kelas sperma yang *Progressive*, kemudian kelas B dimana merupakan kelas sperma yang *non-Progressive*, dan C kelas sperma yang *imotil*. Maka berdasarkan grade di atas, untuk kelas A, perhitungan persentase sperma diambil dari grade 2 dan 3, untuk kelas B diambil dari grade 1, dan kelas C diambil dari grade 0. Setelah data lengkap, kemudian diolah menggunakan statistik untuk melihat signifikansinya.

d. Perhitungan Jumlah Sperma

Setelah dilakukan pengamatan pada motilitas sperma, maka dilakukan perhitungan konsentrasi sperma. Langkah awal yang dilakukan untuk menghitung konsentrasi sperma, adalah membuat suspensi sperma kembali dari bagian kauda epididimis yang lain. Setelah mendapatkan suspensi, suspensi tersebut diambil sebanyak 500 μl lalu ditempatkan ke dalam kamar hitung *Haemocytometer Neubauer* serta ditutup dengan cover glass untuk selanjutnya diamati dengan bantuan mikroskop cahaya. Berikut adalah gambar ilustrasi bagaimana cara memasukan sampe ke dalam kamar hitung *Haemocytometer Neubauer* yang tercantum pada Gambar 3.1:



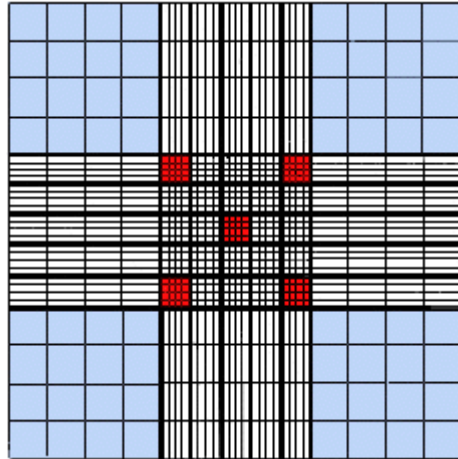
Gambar 3.1. Cara memasukan sampel dalam kamar hitung Neubauer
(Dhurbagiri, 2016)

Cara yang umum digunakan untuk perhitungan sperma adalah dengan menghitung jumlah sperma per ejakulat. Menurut Soeharno (1987 dalam Fitria, 2011), pemeriksaan dilakukan untuk menghitung jumlah sperma dilakukan melalui dua tahap, yaitu:

1. Menghitung secara perkiraan, berapa jumlah sperma per lapang pandang.
2. Jumlah spermatozoa per mL ditentukan dengan menggunakan kamar hitung improved Neubauer.

Untuk langkah pada *point* satu, artinya menghitung jumlah spermatozoa secara perkiraan pada salah satu bilik hitung Neubauer untuk ditentukan pengenceran yang akan dilakukan dan jumlah kotak yang akan dihitung (Ilyas, 2007 dalam Mayta, 2014) pada

Tabel 3.3. Berikut adalah gambar ilustrasi salah satu bilik kamar *Improved Neubauer* Haemocytometer (yang bertanda merah). Karena ada beberapa jenis bilik hitung, tapi yang sering digunakan adalah bilik hitung yang menggunakan garis bagi “*Improved Neubauer*” pada Gambar 3.2:



Gambar 3.2. Bilik Hitung “*Improved Neubauer*”

(Dhurbagiri, 2016)

Salah satu contoh bilik hitung lainnya adalah *Original Neubauer*, (yang berwarna biru) dimana ukuran bidang biliknya lebih besar dan berjumlah 16 kotak. Sedangkan *Improved Nebaur* berjumlah 25 kotak. Setelah menghitung jumlah sperma secara perkiraan, berapa per lapang pandang, maka dilanjutkan pada *point* dua, yaitu menghitung jumlah spermatozoa per mL dengan menggunakan bantuan kamar hitung Neubauer. Tabel 3.3 berisi tentang cara melakukan pengenceran yang disesuaikan dengan jumlah sperma yang ditentukan, juga jumlah kotak yang nantinya harus dihitung:

Tabel 3.3. Pengenceran yang dilakukan dan kotak yang dihitung

No	Jumlah Spermatozoa dalam salah satu bilik hitung	Pengenceran	Kotak yang dihitung
1	>40	50 kali	5 kotak
2	15-40	20 kali	10 kotak
3	<15	10 kali	25 kotak

(Ilyas, 2007 dalam Mayta, 2014)

Sedangkan Tabel 3.4. berisi cara melakukan pengenceran beserta beberapa opsi, opsi yang tersedia hanya dipilih salah satu.

Tabel 3.4. Cara pengenceran spermatozoa

No	Pengenceran	Cara melakukan pengenceran
1	50 kali	a. 980 µl larutan PBS + 20 µl suspensi spermatozoa b. 2.450 µl larutan PBS + 50 µl suspensi sperma
2	20 kali	a. 950 µl larutan PBS + 50 µl suspensi sperma
3	10 kali	a. 900 µl larutan PBS + 100 µl suspensi sperma b. 450 µl larutan PBS + 50 µl suspensi sperma

(Ilyas, 2007 dalam Mayta, 2014)

Setelah dilakukan perhitungan spermatozoa dengan jumlah kotak yang dihitung sesuai dengan jumlah pengenceran pada tabel di atas. Maka pengukuran jumlah spermatozoa dihitung berdasarkan rumus di bawah ini

$$\text{Jumlah sperma} = n \times 10.000 \times FP \times \frac{25}{k} \times \text{volume NaCl}$$

(Ilyas, 2007 dalam Mayta, 2014)

Keterangan: n adalah jumlah spermatozoa yang terhitung setelah dilakukan pengenceran. FP merupakan faktor pengenceran yang dilakukan. Angka 25 merupakan jumlah total kotak kecil yang terdapat dalam bilik kamar hitung Neubauer sedangkan k merupakan jumlah kotak kecil yang dihitung pada saat pengamatan. Volume NaCl merupakan volume NaCl fisiologis yang digunakan untuk membantu mengeluarkan spermatozoa dari bagian kauda epididimis. Berikut adalah formulasi hasil perhitungan dalam rumus konsentrasi spermatozoa dalam Tabel

3.5:

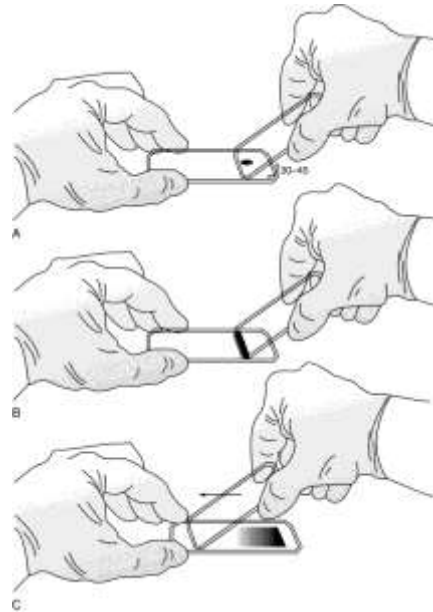
Tabel 3.5. Rumus Konsentrasi Soermatozoa

No	Jumlah kotak yang dihitung	Rumus konsentrasi spermatozoa
1	5	$n \times 10.000 \times 50 \times 5 \times 0.5$
2	10	$n \times 10.000 \times 20 \times 2.5 \times 0.5$
3	25	$n \times 10.000 \times 10 \times 1 \times 0.5$

(Ilyas, 2007 dalam Mayta, 2014)

e. Tahap Pembuatan Apusan Sperma

Sebelum dilakukan pengamatan pada abnormalitas sperma, langkah pertama yang harus dilakukan adalah pembuatan apusan sperma terlebih dahulu. Pertama, cairan sisa suspensi sperma yang telah diamati sebelumnya pada pengamatan motilitas dan konsentrasi sperma diteteskan pada kaca objek di bagian ujung kaca. Kemudian di *smear* menggunakan kaca objek lainnya dengan kemiringan 45° seperti pada Gambar 3.3 berikut ini:

Gambar 3.3. Teknik *Smear* apusan

(Rodak BF, 2012)

Setelah sperma dibuat apusan, hasil *smear* didiamkan hingga kering pada suhu ruangan. Kemudian ditetesi dengan alkohol 96% setelah itu dibiarkan kering kembali. Setelah kering, hasil *smear* tadi diwarnai dengan menggunakan eosin 1%, dan dikeringkan kembali. Setelah kering, kaca objek dibilas dengan alkohol 70%,

Anisa Suci Sugiharti, 2017

PENGARUH EKSTRAK DAUN CIPLUKAN (*PHYSALIS ANGULATA L.*) TERHADAP ASPEK REPRODUKSI MENCIT (*MUS MUSCULUS*) BALB/C JANTAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

lalu dibiarkan kering kembali dan diamati dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 400x. Jumlah sperma yang dihitung adalah 50 setiap spermatozoa pada setiap preparat untuk mengurangi data bias.

f. Pengamatan Abnormalitas Sperma

Setelah mendapatkan apusan, kemudian dilakukan pengamatan abnormalitas sperma dengan cara mengamati morfologi sperma pada setiap preparat dengan bantuan mikroskop binokuler pada perbesaran 400x. Setelah mendapatkan data, kemudian dilakukan perhitungan persentase (%) jumlah sperma abnormal tersebut. Sperma abnormalitas yang dihitung adalah sperma yang memiliki penyimpangan bentuk morfologi dari spermatozoa normal pada mencit. Berikut adalah salah satu ilustrasi morfologi sperma normal pada mencit pada Gambar 3.4:



Gambar 3.4. Spermatozoa mencit normal
(Paula Piomboni, 2014)

g. Tahap Pembuatan Sayatan Histologi Testis

Testis yang sebelumnya sudah direndam dalam formalin pada tahap penimbangan bobot testis kemudian dibuat preparat berupa sayatan melintang, sayatan histologi testis ini sangat diperlukan sebagai bukti utama dalam penelitian ini. Tahap peredaman testis pada larutan formalin 4% merupakan tahap fiksasi, tahap fiksasi

merupakan tahapan dasar dari pembuatan sajian histologi, dimana organ direndam dalam larutan fiksatif selama 24 jam atau lebih dengan tujuan agar organ menjadi awet dan posisi jaringan yang diinginkan tetap berada pada posisinya. Selain pengawetan, tujuan dari dilakukannya fiksasi adalah menghambat terjadinya pembusukan yang disebabkan oleh kuman-kuman pembusuk yang berasal dari luar tubuh juga autolisis (Ahmad, 2009).

Kemudian masuk ke dalam tahap dehidrasi, dimana masing masing organ direndam dalam alkohol dengan konsentrasi meningkat (60%-70%-80%-90%-96%-100%) dengan masing-masing lama waktunya adalah 2 jam dengan menggunakan *shaker*. Proses ini bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan nantinya dapat diisi dengan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Hal ini perlu dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan cairan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat (Ahmad, 2009).

Setelah tahap dehidrasi selesai, maka selanjutnya adalah proses *clearing*. Pembeningan adalah suatu tahap untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin. Jaringan tidak dapat langsung dimasukkan ke dalam parafin karena alkohol dan parafin tidak bisa saling melarutkan. Proses mengeluarkan alkohol dari jaringan ini sangat krusial karena bila di dalam jaringan masih tertinggal sedikit alkohol maka parafin tidak bisa masuk kedalam jaringan sehingga jaringan menjadi “matang diluar, mentah di dalam” dan akan menyebabkan jaringan menjadi sulit untuk dipotong dengan mikrotom (Ahmad, 2009). Proses ini dilakukan dengan cara memasukan organ ke dalam alkohol 100% : Xilol = 1:1 selama maksimal 10 menit, dan xilol murni maksimal 15 menit.

Selanjutnya adalah tahapan infiltrasi, dimana kita membutuhkan oven dalam proses pengerjaannya. Objek atau

preparat dimasukan ke dalam parafin lunak bersih pada suhu 48°C dengan waktu minimal parafin-xilol : 30 menit, parafin I 48°C : 1 jam dan parafin II 56° selama 1 jam. Setelah melewati tahapan di atas, maka organ sudah boleh dimasukan ke dalam *block paraffin*, proses ini dinamakan proses *embedding* (Budiono, 1992)

Pada proses *embedding/blocking* adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom. Untuk membuat blok preparat dapat digunakan 2 macam cara; pertama, cara lama yaitu dengan menggunakan potongan besi berbentuk L (*Leuckhart*), kedua dengan menggunakan cetakan dari plastik dan piringan logam. Dengan cara ini *histoplate* dari plastik diletakkan di atas piringan logam (seperti cetakan membuat es batu) (Ahmad, 2009).

Sedangkan yang digunakan dalam peneitian ini adalah dengan menggunakan cara lama, dimana 2 buah potongan besi L ini disusun diatas lembaran logam hingga rapat dan membentuk ruang seperti kubus yang nantinya sebagai tempat yang digunakan untuk menuangkan parafin. Setelah besi logam L siap, maka parafin dituangkan ke dalamnya dan ditunggu agar sedikit mengeras kemudian organ diletakan di atas nya dengan sangat hati-hati, letak objek disesuaikan dengan orientasi pemotongan yang diatur dengan menggunakan sonde panas. Setelah itu paraffin dituangkan kembali. Jika pada permukaan parafin terdapat gelembung udara, maka gelembung dapat dihilangkan dengan menggunakan jarum khusus yang sebelumnya dipanaskan terlebih dahulu. Setelah *block* mengering, selanjutnya dilakukan penyayatan organ menggunakan mikrotom (Budiono, 1992).

Pertama, *block holder* dipasang pada mikrotom putar, kemudian pisau mikrotom dipasang dan diatur secara tepat pada sudut tertentu. Kemudian dilakukan penyayatan dimulai dengan ketebalan 16 mikron dan selanjutnya menurun sampai 10 mikron.

Tujuannya untuk membuang sisa parafin yang berada di ujung *block* organ dan untuk mendapatkan bagian objek yang lengkap serta untuk mengetahui pada ketebalan berapa mikron pita sayatan terbentuk dengan baik.

Hasil sayatan akan berbentuk pita tipis yang ditengahnya terdapat organ. Hasil pita ini dapat disimpan pada baki yang beralaskan kertas dan diberi penutup di bagian atasnya agar tidak terkena debu atau terkena angin. Tidak lupa parafin dan sayatan yang menempel pada mikrotom dibersihkan kembali dengan menggunakan xilol.

Setelah selesai disayat, organ ditempelkan pada *object glass* yang sebelumnya telah dilapisi albumin dan diberi tetesan *aquadest*. Pita yang telah diletakan di atas *object glass* diatur pola peletakannya (seri atau tunggal) selanjutnya dipanaskan di atas *paraffin heater* bersuhu 45°C dengan tujuan agar pita hasil sayatan ini mengembang maksimal (Budiono, 1992)

Selanjutnya merupakan proses pewarnaan preparat histologi testis menggunakan pewarnaan HE (Hematoksilin Eosin). Diawali dengan proses deparafinisasi dengan menggunakan xilol selama 30 menit dalam *coplin jar* terhadap objek yang telah ditempel. Kemudian hidrasi dimana pita yang sudah ditempel tersebut direndam dalam konsentrasi alkohol menurun, mulai dari (100%-96%-90%-80%-70%) dengan waktu masing-masing 3 menit. Sedangkan untuk proses pewarnaan menggunakan Hematoksilin Eosin, objek dapat direndam lebih lama. Setelah proses pewarnaan selesai, maka objek dibilas menggunakan *aquadest*. Selanjutnya proses dehidrasi pada alkohol bertingkat (60%-70%-80%-90%-96%-100%) dengan waktu 3 menit pada setiap konsentrasi alkohol. Penjernihan kedua menggunakan xilol + alkohol 100% selama 3 menit dan selanjutnya dengan xilol murni selama 3 menit (Budiono, 1992)

Setelah dilakukan penjernihan, maka objek harus segera

diangkat dan ditetesi dengan entelan secukupnya, kemudian ditutup dengan kaca penutup yang telah dicelup pada xylol dan cegah agar tidak ada gelembung yang terjebak di dalam preparat. Objek yang sudah ditempel dengan entelan, ditunggu hingga kering kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop. Pengamatan dilakukan sekaligus menyortir preparat baik atau gagal. Terakhir, preparat yang baik kemudian diberi label.

h. Pengukuran Diameter dan Ketebalan Sel Germinal pada Tubulus Seminiferus

Setelah mendapatkan preparat yang baik, maka untuk menentukan apakah ada perubahan sel spermatogenik atau tidak dilakukan pengukuran pada sel-sel tubulus seminiferus dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 10x. Sel-sel tubulus seminiferus diperiksa secara acak per bagian diameter dan ketebalan lapisan germinal (dari membran basal menuju lumen) dengan menggunakan mikrometer okuler pada mikroskop yang sebelumnya sudah dikalibrasi terlebih dahulu dengan *stage micrometer*.

6. Analisis data

Data yang didapatkan diuji homogenitas dan normalitasnya. Uji normalitas menggunakan uji *Test of Normality (Shapiro-Wilk)* dan uji homogenitas menggunakan *Test of Homogeneity of Variances (Levene Statistic)*. Data yang terdistribusi normal dan bervarian homogen dianalisis secara statistic parametrik yaitu, Analisis varian (*One Way ANOVA*). Data yang memiliki perbedaan signifikan untuk setiap perlakuan kemudian diuji lebih lanjut dengan uji *Tukey HSD^a* dengan α 0,05 pada selang kepercayaan 95%. Analisis data diproses dengan menggunakan *Software SPSS 22 for Windows*.