

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimen. Hal ini karena adanya manipulasi terhadap objek penelitian (Nazir, 2003). Adapun objek penelitian dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan berumur 3 – 4 bulan dengan bobot tubuh 35 – 40 gram (Ridwan, 2013). Mencit jantan dengan umur dan bobot tersebut digunakan karena pada umur dan bobot tersebut mencit dianggap sudah cukup dewasa serta kondisi fisiologis tubuhnya sudah siap menerima pemberian perlakuan. Pengamatan dilakukan pada bobot badan mencit setiap hari selama perlakuan dan aspek reproduksi mencit setelah dilakukan pembedahan yang meliputi bobot testis, jumlah sperma dan abnormalitas sperma setelah diberi perlakuan dengan induksi siklofosfamid dan pemberian ekstrak bunga kecombrang (*Etlingera elatior*) dengan berbagai dosis yang sudah ditentukan.

3.2 Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah berupa rancangan acak lengkap (RAL) dimana terdapat perlakuan yang diberikan kepada seluruh unit penelitian secara acak. Hal ini dilakukan karena lingkungan tempat penelitian relatif homogen dengan anggapan bahwa tempat penelitian tidak akan memberikan pengaruh yang berarti pada respon dan parameter yang akan diamati (Henry, 2012; Nazir, 2003).

Dosis ekstrak bunga kecombrang yang diberikan adalah sebesar 0; 5; 10; 15 atau 20 mg/kg BB yang merupakan modifikasi dari penelitian Canalovta (2014). Ekstrak bunga kecombrang diberikan setiap hari pada pagi hari selama 14 hari. Mencit dikelompokkan menjadi enam kelompok berdasarkan jumlah dosis yang diberikan dengan kelompok kontrol dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol positif dan kontrol negatif.

Kontrol positif adalah kelompok mencit yang diinduksi dengan siklofosfamid dan hanya diberi aquades sebagai pengganti ekstrak bunga kecombrang. Kontrol negatif adalah kelompok mencit yang tidak diinduksi dengan siklofosfamid dan hanya diberi aquades sebagai pengganti ekstrak bunga kecombrang.

Variabel bebas dan variabel terikat pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel bebas : Ekstrak kecombrang yang diberikan
2. Variabel terikat : Bobot tubuh, bobot testis, jumlah sperma dan abnormalitas sperma.

Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) pada masing-masing kelompok perlakuan diperoleh dari perhitungan menggunakan rumus dari Federer (1983) yaitu :

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

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

$$5(r - 1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$r \geq 20/5$$

$$r \geq 4$$

$$r = 4 \text{ ekor mencit}$$

Keterangan : r = jumlah replikasi

T = jumlah perlakuan

Pengacakan kandang dan pemberian nomor pada mencit dilakukan untuk menghilangkan bias pada saat pengambilan data (Sudjana, 2006). Hasil pengacakan kandang dapat dilihat pada Tabel 3.1 berikut.

Tabel 3.1
*Hasil Pengacakan Kandang dan Jenis Perlakuan Ekstrak Bunga
 Kecombrang*

Kandang Mencit					
A8	D13	C22	A17	E7	C20
C14	A2	E16	F12	B24	B3
B11	E15	D1	A21	C4	D18
F6	B5	F19	F10	D23	E9

Berdasarkan pengacakan kandang pada Tabel 3.1, maka pembagian kandang mencit berdasarkan penomoran dan perlakuan yang diberikan ditampilkan dalam Tabel 3.2 di bawah ini:

Tabel 3.2
Pembagian Kandang Mencit

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

Keterangan:

- A : Kontrol negatif, tidak diberi induksi siklofosfamid dan diberi aquades
- B : Kontrol positif, diberi induksi siklofosfamid dan diberi aquades
- C : Diberi ekstrak bunga kecombrang 5 mg/kg BB
- D : Diberi ekstrak bunga kecombrang 10 mg/kg BB
- E : Diberi ekstrak bunga kecombrang 15 mg/kg BB
- F : Diberi ekstrak bunga kecombrang 20 mg/kg BB
- 1, 2, 3 ... : Nomor mencit

3.3 Populasi dan Sampel

Pada penelitian ini, populasinya adalah mencit (*Mus musculus*). Sedangkan sampelnya adalah mencit (*Mus musculus*) jantan berusia 3 – 4 bulan dengan bobot tubuh 35 – 40 gram yang diinduksi dengan siklofosfamid dan diberi ekstrak bunga kecombrang. Pengamatan yang dilakukan terhadap sperma mencit dan parameter yang diamati adalah kualitas sperma meliputi bobot testis, jumlah sperma, motilitas sperma dan abnormalitas sperma. setelah pemberian ekstrak bunga kecombrang dengan dosis yang berbeda.

3.4 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama tiga bulan dari bulan April hingga Juni 2018. Penelitian dilakukan mulai dari aklimatisasi mencit hingga pengolahan data yang didapatkan. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan pada mencit dilakukan di rumah hewan Kebun Botani UPI. Pembuatan ekstrak bunga kecombrang dilakukan di Laboratorium Riset Lingkungan FPMIPA UPI. Perhitungan parameter kualitas sperma dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan FPMIPA UPI.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Alat Bahan dan Hewan Uji

Alat dan bahan yang diperlukan disiapkan. Tempat penyimpanan mencit digunakan sebanyak 6 buah kandang berukuran 40 x 30 x 25 cm. Sebelum digunakan, kandang dibersihkan, lalu diberikan serbuk kayu secukupnya, diberi tempat pakan dan tempat minum. Kandang diletakkan di tempat yang memiliki penyinaran dan sirkulasi udara yang baik, serta aman dari gangguan-gangguan seperti suara bising atau hewan besar.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan usia 3 – 4 bulan dengan bobot tubuh 35 – 40 gram. Mencit didapatkan dari PT. Biofarma Lembang. Mencit kemudian dikelompokan ke dalam enam buah kandang sesuai kelompoknya yang

masing-masing berisi empat ekor mencit. Pengelompokan tersebut dilakukan berdasarkan perbedaan jenis perlakuan yang diberikan. Mencit kemudian diaklimatisasi selama satu minggu dan diberi pakan dan minum secara *ad libitum*. Pada akhir aklimatisasi, mencit ditimbang untuk diamati perubahan bobot tubuhnya.

3.5.2 Pembuatan Ekstrak Bunga Kecombrang

Bunga kecombrang didapatkan secara *online* dari perkebunan sayuran di Bogor, lalu bunga dipisahkan dari tangkainya. Bunga yang sudah terpisah dari tangkainya kemudian dirajang lalu ditimbang dan dikeringkan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari sampai kering lalu ditimbang kembali. Setelah kering, bunga dihaluskan dengan cara diblender beberapa kali lalu diayak untuk memisahkan antara serbuk bunga yang halus dan kasar kemudian hasil serbuk bunga yang halus ditimbang kembali untuk ditentukan dosis pemberian terhadap mencitnya.

3.5.3 Penentuan Dosis

Dosis ekstrak bunga kecombrang yang diberikan kepada mencit adalah sebesar 0 (kontrol); 5; 10; 15 atau 20 mg/kg BB yang merupakan modifikasi dari penelitian Canalovta (2014). Selain kelompok yang diberi ekstrak bunga kecombrang, terdapat dua kelompok perlakuan kontrol yaitu kontrol positif dan kontrol negatif.

Perhitungan dosis yang diberikan disesuaikan dengan bobot tubuh mencit. Bobot tubuh mencit yang digunakan adalah sebesar 35 – 40 gram. Perhitungan dosis berdasarkan bobot tubuh adalah sebagai berikut:

$$\text{Dosis } 5 \text{ mg/kg BB} = \frac{5 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 35 \text{ gr} = 0,175 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis } 10 \text{ mg/kg BB} = \frac{10 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 35 \text{ gr} = 0,35 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis } 15 \text{ mg/kg BB} = \frac{15 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 35 \text{ gr} = 0,525 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis } 20 \text{ mg/kg BB} = \frac{20 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 35 \text{ gr} = 0,70 \text{ mg}$$

Ekstrak bunga kemudian ditimbang dan untuk pemberian kepada mencit, ekstrak dilarutkan dalam aqua *pro injection* sebanyak 0,5 mL untuk masing-masing mencit. Hal ini disebabkan karena kapasitas lambung mencit maksimal sebanyak 0,5 mL.

3.5.4 Pemberian Siklofosfamid

Siklofosfamid didapatkan dari apotek *Medicastore* dan diberikan kepada mencit dengan dosis sebanyak 50 mg/kg BB mencit. Dosis ini diberikan berdasarkan penelitian (Rahmawati & Tabran, 2015). Siklofosfamid dibuat stoknya dengan melarutkan 1 gram siklofosfamid dalam 100 mL aquades. Perhitungan dosis untuk pemberian siklofosfamid adalah sebagai berikut:

$$\text{Dosis } 50 \text{ mg/kg BB} = \frac{50 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 35 \text{ gr} = 1,75 \text{ mg}$$

Larutan siklofosfamid dibuat berdasarkan dosis pemberian dan bobot mencit maksimal. Siklofosfamid diberikan secara injeksi intravena melalui ekor mencit menggunakan *syringe needle*. Induksi siklofosfamid diberikan selama satu hari sebelum dilakukan pemberian ekstrak bunga kecombrang. Setelah 30 jam, mencit lalu diberikan ekstrak bunga kecombrang.

3.5.5 Pemberian Ekstrak Bunga Kecombrang

Ekstrak bunga kecombrang (*Etlingera elatior*) yang disudah dibuat dan dihitung, kemudian diberikan secara oral dengan menggunakan jarum *gavage*. Ekstrak diberikan kepada mencit sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan. Ekstrak diberikan setiap hari pada pagi hari selama 14 hari. Selama pemberian ekstrak, mencit tetap diberi pakan setiap hari sebanyak 10 gram per mencit dan minum.

3.5.6 Analisis Aspek Reproduksi

a. Perhitungan Bobot Testis

Frizka Ayuningtyas, 2018

*PENGARUH EKSTRAK BUNGA KECOMBRANG (*Etlingera elatior*) TERHADAP KUALITAS SPERMA MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN YANG DIINDUKSI SIKLOFOSFAMID*
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

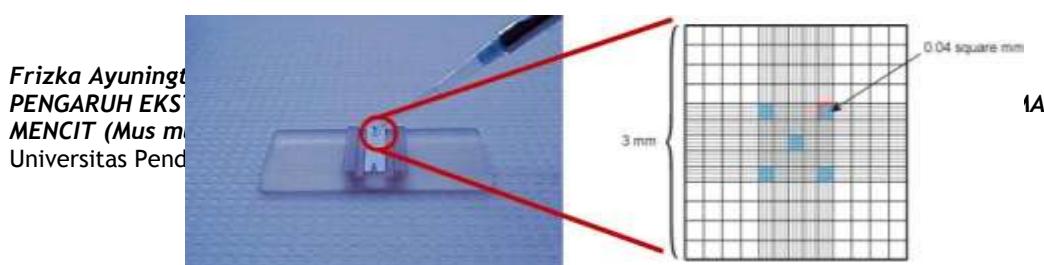
Pertama, mencit didislokasi lehernya lalu dibedah untuk diambil organ reproduksinya yaitu testis. Testis kanan dan kiri diambil untuk kemudian dihitung bobotnya dengan menggunakan timbangan analitik. Hasil penimbangan testis dicatat kemudian dibandingkan dengan bobot testis yang diberi tidak diberi perlakuan (tanpa ekstrak dan siklofosfamid, hanya aquades saja). Hasil dari perhitungan bobot testis tadi kemudian diolah dengan uji statistik menggunakan SPSS untuk dilihat signifikansinya.

b. Pembuatan Suspensi Sperma

Sperma disuspensikan ke dalam larutan NaCl fisiologis 0,9% untuk perhitungan jumlah sperma, pembuatan preparat apusan sperma dan pengamatan abnormalitas sperma. Larutan NaCl fisiologis 0,9% dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 0,9 gram serbuk NaCl ke dalam 100 mL aquades, lalu dihomogenkan. Untuk membuat suspensi sperma yang harus dilakukan adalah testis dengan kauda epididimisnya ditempatkan pada kaca arloji atau cawan petri yang sudah berisi larutan NaCl fisiologis 0,9%, lalu sperma dikeluarkan dengan cara memotong bagian kauda epididimis dengan *scalpel* dan ditekan secara perlahan hingga cairan semen keluar. Kemudian suspensi sperma dihomogenkan dengan menggunakan mikropipet.

c. Perhitungan Jumlah Sperma

Langkah pertama yang dilakukan untuk menghitung jumlah sperma adalah menghitung konsentrasi sperma. Untuk menghitung jumlah sperma, perlu dibuat suspensi sperma terlebih dahulu. Suspensi sperma yang dibuat dari bagian kauda epididimis diambil sebanyak 500 μL dan ditempatkan dalam kamar hitung hemositometer dan ditutup dengan kaca penutup. Lalu diamati dengan bantuan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Bagian yang diamati dari hemositometer dapat dilihat pada Gambar 3.1 berikut ini.



Gambar 3.1 Hemositometer dan *counting chamber* untuk Menghitung Jumlah Sperma
 (Parhizkar, 2014)

Cara yang umum digunakan untuk perhitungan sperma adalah perhitungan jumlah sperma per ejakulat. Perhitungan jumlah sperma dapat dilakukan dengan dua tahap, yaitu :

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

Sperma dihitung pada salah satu bilik Nebauer, lalu ditentukan pengenceran yang akan dilakukan dan jumlah kotak yang akan dihitung. Setelah dilakukan perhitungan secara perkiraan, dilakukan pengenceran yang disesuaikan dengan jumlah sperma yang ditemukan. Cara untuk melakukan pengenceran ditunjukkan pada Tabel 3.3 di bawah ini:

Tabel 3.3
Jumlah Pengenceran Berdasarkan Perkiraan

No	Jumlah sperma dalam 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

(Sumber: Ilyas, 2007)

Setelah mengetahui jumlah sperma dalam satu bilik hitung berdasarkan perkiraan, sperma diencerkan kembali dengan menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS) dan cara pengencerannya ditunjukkan dalam Tabel 3.4, sebagai berikut :

Tabel 3.4
Cara Pengenceran Sperma dengan PBS

No	Pengenceran	Cara Pengenceran
1.	50 kali	980 μ L larutan PBS + 20 μ L suspensi sperma
2.	20 kali	950 μ L larutan PBS + 50 μ L suspensi sperma
3.	10 kali	900 μ L larutan PBS + 50 μ L suspensi sperma

(Sumber: Ilyas, 2007)

Setelah dilakukan perhitungan jumlah sperma yang ditemukan berdasarkan pengenceran, maka penghitungan jumlah sperma dihitung dengan menggunakan rumus di bawah ini:

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

Keterangan :

n : Jumlah sperma yang terhitung setelah dilakukan pengenceran

FP : Faktor pengenceran

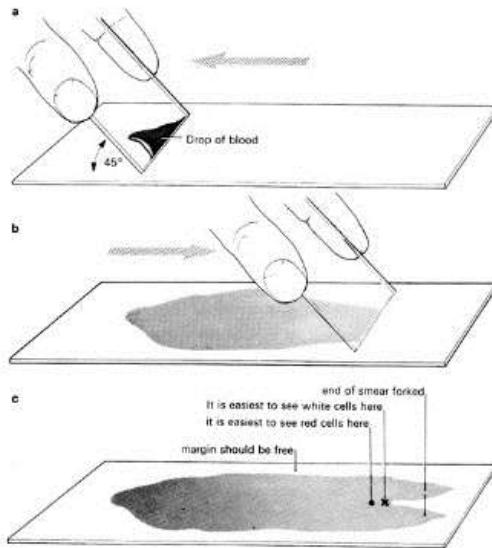
25 : Jumlah kotak kecil dalam kamar hitung Neubauer

k : Jumlah kotak kecil yang dihitung

Hasil perhitungan kemudian dicatat dalam tabel dan dibandingkan jumlahnya antar masing-masing kelompok perlakuan.

d. Pembuatan Apusan Sperma

Cara membuat preparat apusan sperma adalah cairan sisa suspensi sperma pada pengamatan jumlah sperma diteteskan sedikit pada kaca objek di salah satu ujung kacanya. Setelah itu, di *smear* dengan menggunakan ujung kaca objek lainnya dengan kemiringan 45°. *Smear* atau apusan dibuat setipis mungkin agar tidak ada sperma yang bertumpuk ketika diamati. Cara membuat *smear* sperma dapat dilihat pada Gambar 3.2 berikut ini.



Gambar 3.2 Cara *Smear* Sperma
(Nuffield, 2018)

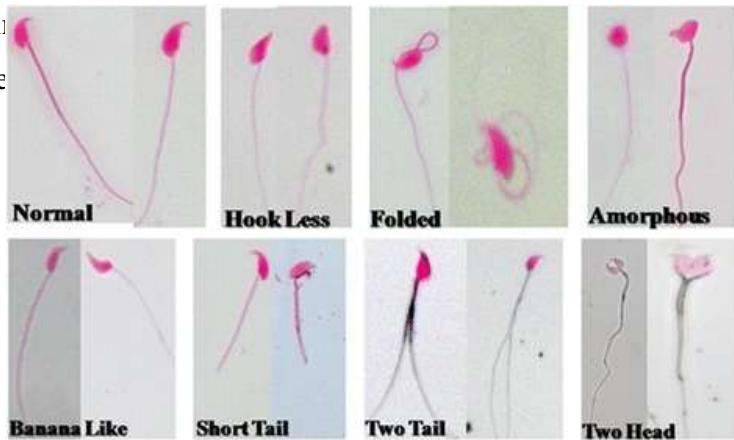
Setelah dibuat apusan, hasil *smear* didiamkan dalam ruangan hingga kering. Lalu difiksasi dengan menggunakan alkohol 96% dan didiamkan. Setelah kering, hasil *smear* diwarnai dengan menggunakan pewarna hematoxylin eosin setelah itu dibilas dengan menggunakan alkohol 70% dengan cara dialirkan di atas apusan sperma menggunakan pipet. Lalu didiamkan hingga kering kembali dan preparat dapat diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Hasil pengamatan kemudian didokumentasikan untuk diamati abnormalitasnya.

e. Abnormalitas Sperma

Abnormalitas pada sperma diamati dengan cara melihat morfologi dari setiap preparat apusan sperma yang sudah dibuat sebelumnya dengan bantuan mikroskop cahaya. Setelah mendapatkan data, kemudian dilakukan perhitungan persentase jumlah sperma yang abnormal dari sejumlah sperma yang teramat. Sperma mencit dianggap abnormal apabila sperma memiliki penyimpangan bentuk morfologi dari morfologi sperma normal mencit yang seharusnya. Sperma normal mencit yang

seharusnya adalah kepala sperma berbentuk seperti tetesan air (*tear drop*) dan pada ujung kepalanya memiliki bagian seperti kait. Bentuk sperma mencit normal dan berbagai macam bentuk-bentuk abnormalitas dan penyimpangan yang terjadi pada bentuk dan ukuran kepala dan ekor sperma.

3.3 be



Gambar 3.3 Morfologi Sperma Mencit
(Khan, 2015)

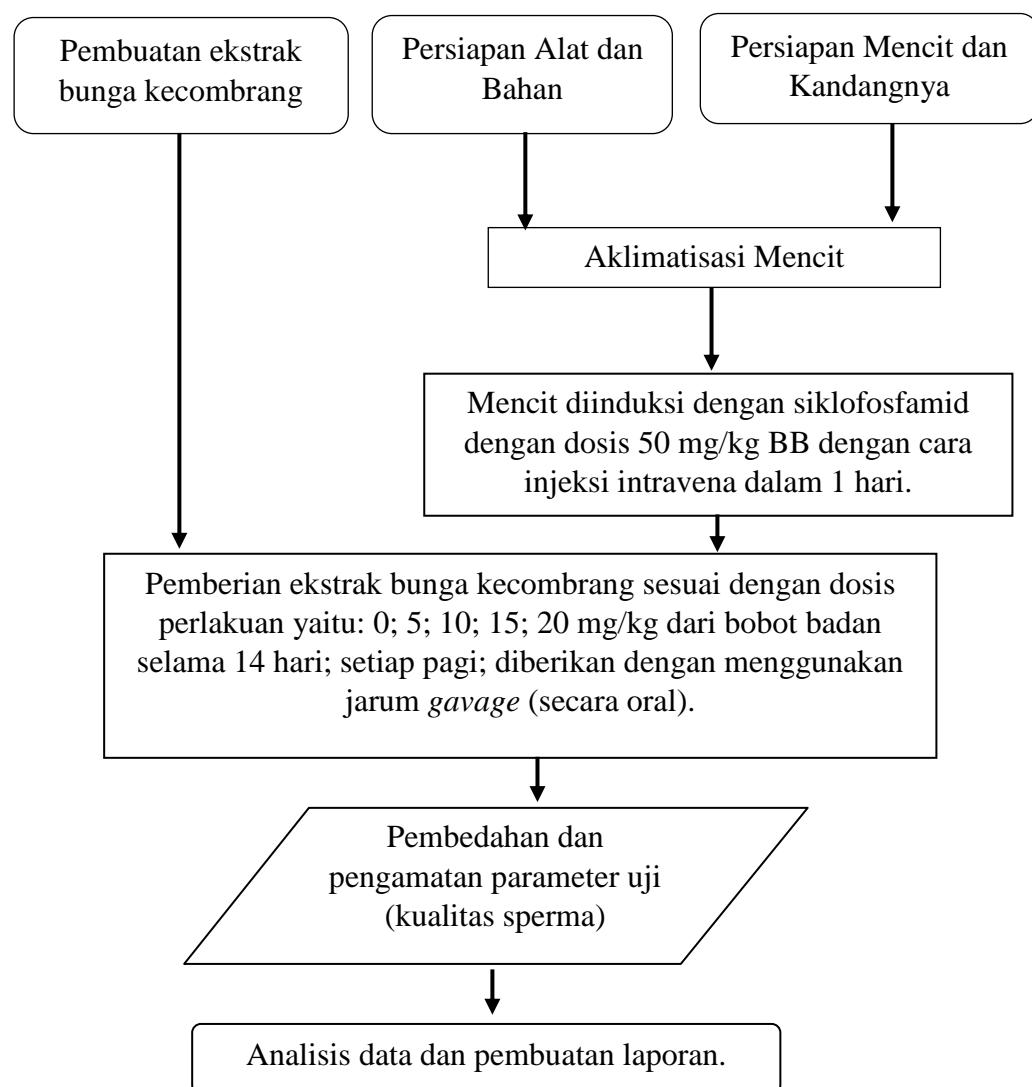
f. Analisis Statistik

Data hasil perhitungan parameter kualitas sperma kemudian dianalisis statistik menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistics 22 for Windows. Terdapat beberapa uji statistik yang dilakukan untuk menganalisis data hasil perhitungan parameter kualitas sperma tersebut. Distribusi data normal dianalisis dengan uji normalitas Shapiro-Wilk atau Kolmogorov-Smirnov, dilanjutkan dengan uji variasi homogenitas Levene test. Data yang normal dan homogen kemudian dianalisis dengan uji One-Way ANOVA. Perbedaan signifikansinya dianalisis dengan menggunakan uji Tukey HSD dengan ($P < 0.05$). Data yang tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, diuji dengan uji nonparametrik uji Kruskal-Wallis.

3.6 Alur Penelitian

Alur dalam penelitian ini terbagi menjadi tiga tahapan, yaitu tahapan pra-penelitian atau persiapan, tahapan penelitian dan tahapan *post-*

penelitian atau analisis data. Bagan alur dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.4 pada halaman selanjutnya.



Gambar 3.4
Bagan Alur Penelitian