

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental (*experiment research*), yaitu penelitian yang berusaha mencari pengaruh variabel tertentu terhadap variabel lain dengan kontrol yang ketat dalam kondisi yang terkendalikan (Sugiyono, 2012; Sedarmayanti dan Syarifudin, 2002:33)

### B. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdapat tiga kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol, masing-masing Kelompok perlakuan terdiri dari lima kelas dengan pemberian maserat air daun Jati Belanda sebanyak 0,05 g/BB/hari; 0,10 g/BB/hari; 0,15 g/BB/hari; 0,20 g/BB/hari serta 0,25 g/BB/hari (Adjirni, *et al.*, 2001; Sukandar, *et al.*, 2004; Utomo, 2008 dalam Yulianty dan Mardiah, 2012). Kelompok kontrol hanya diberi akuades setiap harinya. Banyaknya replikasi di dapatkan dari rumus Federer, 1983 dengan perhitungan sebagai berikut :

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

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

$$n \geq 4$$

**Keterangan:** T = jumlah perlakuan

n = jumlah replikasi

Dari hasil perhitungan di atas, maka jumlah pengulangan untuk setiap perlakuan  $n \geq 4$ , perlakuan dilakukan secara oral (*gavage*) sesuai dengan dosis yang di tentukan selama 14 hari, penelitian ini menggunakan 72 ekor tikus. kelompok 1; 24 ekor tikus

pada akhir perlakuan di bunuh (0 hari perawatan pasca pemberian maserat), kelompok 2; 24 ekor tikus setelah 7 hari perawatan pasca pemberian maserat di bunuh, dan kelompok 3;24 ekor tikus setelah 14 hari perawatan pasca pemberian maserat di bunuh, tujuan perawatan pasca pemberian maserat daun Jati Belanda untuk mengetahui *reversibilitas* kualitas sperma. Pembagian mencit untuk setiap kelas di lakukan secara acak, pengacakan di lakukan untuk menghilangkan bias (Sudjana, 2002).

**Tabel 3.1** Peta Kandang Berdasarkan Hasil pengocokan

Kandang	Nomor Mencit			
A <sub>1</sub>	6	25	8	15
A <sub>2</sub>	57	41	42	26
A <sub>3</sub>	16	69	7	55
B <sub>1</sub>	58	28	70	56
B <sub>2</sub>	71	68	29	14
B <sub>3</sub>	30	1	43	54
C <sub>1</sub>	59	67	2	53
C <sub>2</sub>	11	31	17	18
C <sub>3</sub>	72	40	35	52
D <sub>1</sub>	24	66	3	51
D <sub>2</sub>	60	9	27	4
D <sub>3</sub>	61	39	34	50
E <sub>1</sub>	5	65	20	49
E <sub>2</sub>	62	32	44	19
E <sub>3</sub>	36	64	10	48
F <sub>1</sub>	21	12	45	47
F <sub>2</sub>	37	63	33	13
F <sub>3</sub>	23	38	22	46

## Keterangan :

- A : Kontrol Negatif
- B<sub>1</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,05 g/BB/hari dan nol hari perawatan pasca pemberian maserat.
- B<sub>2</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,05 g/BB/hari dan 7 hari perawatan pasca pemberian maserat.
- B<sub>3</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,05 g/BB/hari dan 14 hari perawatan pasca pemberian maserat.
- C<sub>1</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,10 g/BB/hari dan nol hari perawatan pasca pemberian maserat.
- C<sub>2</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,10 g/BB/hari dan 7 hari perawatan pasca pemberian maserat.
- C<sub>3</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,10 g/BB/hari dan 14 hari perawatan pasca pemberian maserat.
- D<sub>1</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,15 g/BB/hari dan nol hari perawatan pasca pemberian maserat.
- D<sub>2</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,15 g/BB/hari dan 7 hari perawatan pasca pemberian maserat.
- D<sub>3</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,15 g/BB/hari dan 14 hari perawatan pasca pemberian maserat.
- E<sub>1</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,20 g/BB/hari dan nol hari perawatan pasca pemberian maserat.
- E<sub>2</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,20 g/BB/hari dan 7 hari perawatan pasca pemberian maserat.
- E<sub>3</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,20 g/BB/hari dan 14 hari perawatan pasca pemberian maserat.
- F<sub>1</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,25 g/BB/hari dan nol hari perawatan pasca pemberian maserat.

F<sub>2</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,25 g/BB/hari dan 7 hari perawatan pasca pemberian maserat.

F<sub>3</sub> : Diberi maserat daun Jati Belanda dengan dosis 0,25 g/BB/hari dan 14 hari perawatan pasca pemberian maserat.

1,2,3 dst: Nomor mencit

### C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah 72 ekor mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur *Swiss Webster*, berumur 8-12 minggu, berat badan 27-35 gram yang diperoleh dari peternakan sendiri di kebun botani UPI, sedangkan sampel yang digunakan dalam penelitian adalah sperma mencit (*Mus musculus* L.) galur *Swiss webster*.

### D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Rumah Mencit Kebun botani FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia Bandung, sebagai tempat pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba. Laboratorium Fisiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia untuk Pembuatan maserat, penyiapan bahan yang diperlukan, dan pengamatan bentuk sperma abnormal. Sedangkan pengambilan sampel sperma, dan pengamatan kualitas sperma dilakukan di Laboratorium struktur hewan FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung. Penelitian ini dilaksanakan selama 6 bulan, yaitu pada bulan Maret 2013 sampai September 2013.

### E. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Fisiologi Universitas Pendidikan Indonesia dan di kandang mencit kebun Botani FPMIPA UPI, Bandung. Daftar Alat-alat yang digunakan selama penelitian terdapat pada lampiran 29A, Sedangkan daftar bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdapat pada lampiran 29B.

## F. Prosedur Penelitian

### 1. Tahap persiapan

pada tahapan persiapan ini meliputi pembuatan kandang dan pengumpulan bahan maserat daun Jati Belanda dan cara pembuatannya. Hewan percobaan di tempatkan dalam kandang yang disusun pada rak-rak di rumah mencit Kebun Botani FPMIPA UPI, Bandung. Kandang terbuat dari bak plastik berukuran 40 cm x 30 cm x 12 cm, medium yang digunakan untuk hidup mencit berupa serutan kayu, bagian atas diberi kawat dan di beri tempat minum mencit sebanyak 1 buah setiap kandang.

Bubuk daun Jati Belanda didapatkan dari pemasok obat herbal babah kuya di daerah pasar baru. Pembuatan maserat dilakukan dengan cara *hidolytic maseration* atau maserasi hidrolisis yaitu maserasi dengan menggunakan air sebagai pelarut (ICSH, 2008 dalam Yulianti 2012).

Pembuatan stok maserat dilakukan dengan cara melarutkan 1 bagian bubuk daun Jati Belanda ke dalam 10 bagian akuades. Kemudian didiamkan dalam wadah tertutup aluminium foil selama 24 jam pada suhu ruangan serta diberi agitasi 90 rpm. Setelah 24 jam, larutan disaring dan residunya diperas. Setelah itu maserat cair diuapkan pada suhu 70 °C pada waterbath kurang lebih selama 8 jam hingga cairan berubah menjadi pasta kental. Pasta kemudian disimpan dalam wadah tertutup dan dijadikan sebagai stok untuk dijadikan maserat (Indriani, 2006; ICSH, 2008). Masing-masing dosis dilakukan pengenceran, persentase pengenceran di dasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yulianti (2012) sebagai berikut.

- 1) 0,05 g/BB/hari  
1,0 gram pasta dilarutkan dalam aquades hingga 10 ml, kemudian diberikan sebanyak 0,5 ml/hari/ekor mencit.
- 2) 0,10 g/BB/hari  
2,0 gram pasta dilarutkan dalam aquades hingga 10 ml, kemudian diberikan sebanyak 0,5 ml/hari/ekor mencit.
- 3) 0,15 g/BB/hari



3,0 gram pasta dilarutkan dalam aquades hingga 10 ml, kemudian diberikan sebanyak 0,5 ml/hari/ekor mencit.

4) 0,20 g/BB/hari

4,0 gram pasta dilarutkan dalam aquades hingga 10 ml, kemudian diberikan sebanyak 0,5 ml/hari/ekor mencit.

5) 0,25 g/BB/hari

5,0 gram pasta dilarutkan dalam aquades hingga 10 ml, kemudian diberikan sebanyak 0,5 ml/hari/ekor mencit.

6) 0,00 g/BB/hari (kontrol)

Terdiri dari akuades tanpa pasta daun Jati Belanda.

Range 0,05 g/BB/hari hingga 0,25 g/BB/hari merupakan dosis aman penggunaan maserat Jati Belanda, sedangkan dosis lethal sendiri berjumlah 1,34 gram/BB/hari (Adjirni, *et al.*, 2001).

## 2. Tahap penelitian

Tahap penelitian ini meliputi, aklimatisasi mencit, penentuan dosis, pemberian maserat daun Jati Belanda, penghitungan konsentrasi sperma, pengamatan motilitas sperma, pengamatan kecepatan sperma, dan pengamatan abnormalitas sperma.

### a. Aklimatisasi Mencit

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 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 satu kali dalam seminggu.

#### **b. Penentuan Dosis**

Dosis yang diberikan pada penelitian ini terdiri dari 0,00 g/BB/hari(kontrol); 0,05 g/BB/hari; 0,10 g/BB/hari; 0,15 g/BB/hari; 0,20 g/BB/hari; dan 0,25 g/BB/hari. Range antara 0,05 g/BB/hari hingga 0,25 g/BB/hari diambil berdasarkan pada penelitian Adjirni (2001) dan Rahardjo (2006). Range 0,05 g/BB/hari hingga 0,25 g/BB/hari merupakan dosis aman penggunaan maserat Jati Belanda, sedangkan dosis *lethal* sendiri berjumlah 1,34 gram/BB/hari (Adjirni, *et al.*, 2001).

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

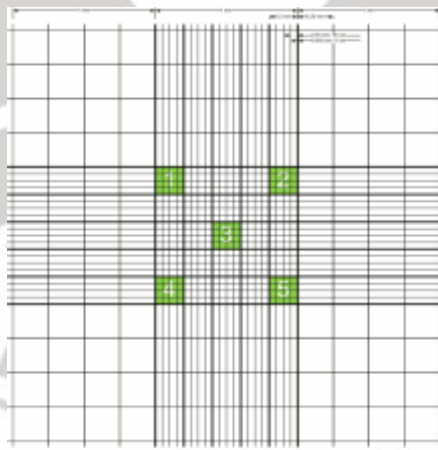
Pemberian maserat daun Jati Belanda di dasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yulianti (2012) dilakukan selama 14 hari secara *gavage*, satu kali dalam sehari. Tiap mencit dalam kelompok perlakuan diberi maserat daun Jati Belanda sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Maserat daun Jati Belanda yang diberikan adalah sebesar 0,5 ml/hari untuk masing-masing konsentrasi. Hal ini bertujuan agar lambung mencit dapat menampung maserat daun Jati Belanda selain pakan yang diberikan. Selama pemberian maserat (2 minggu), mencit diberi pakan standar sebanyak 5 g/ekor dan minum secara *ad libitum*.

#### **d. Penghitungan Konsentrasi Sperma**

Hewan uji yang telah diberi perlakuan pemberian maserat selama 14 hari dimatikan dengan cara dislokasi leher kemudian dibedah dan dipisahkan organ reproduksinya. Konsentrasi sperma per ml suspensi semen dari *cauda epididymis* diamati dengan cara mengambil organ testis beserta *epididymis* lalu diletakkan di dalam petridisk yang berisi NaCl 0,9%. Kemudian *cauda epididymis* dipisahkan dengan cara memotong bagian proksimal korpus *epididymis* dan bagian distal *vas*

*deferens* dengan menggunakan mikroskop binokuler pada pembesaran 400 kali (Yulianti, 2012).

Bagian *cauda epididymis* yang telah dipotong tersebut dimasukkan ke dalam gelas arloji yang berisi 1 ml NaCl 0,9%. Kemudian bagian proksimal cauda sedikit dipotong dengan menggunakan gunting. Setelah cauda terpotong, maka dilakukan penekanan dengan perlahan hingga cairan *epididymis* keluar dan tersuspensi dengan NaCl 0,9%. Penekanan dilakukan dengan menggunakan spatula atau sonde. Kemudian suspensi dihomogenkan, sehingga didapatkan campuran semen yang tersuspensi dengan baik. Kemudian suspensi semen tersebut diambil sebanyak 10  $\mu$ l lalu ditetaskan ke dalam *Haemocytometer Neubauer*. Serta ditutup dengan *cover glass* untuk selanjutnya diamati dan dihitung konsentrasi sperma yang ada di bawah mikroskop cahaya (Machmudin dalam Yulianti, 2012). Penghitungan Jumlah sperma/ml suspensi semen dari cauda *epididymis* dengan menggunakan rumus berikut. **Jumlah sperma =  $N/2 \times 10^5$  sperma/ml** (Suparni dalam Yulianti, 2009). Keterangan: N=jumlah sperma pada kotak A, B, C, D, dan E (*improved nebauer haemocytometer*).



**Gambar 3.1.** *Improved Neubauer* (Haemocytometer)  
(Sumber: <http://braukaiser.com>)

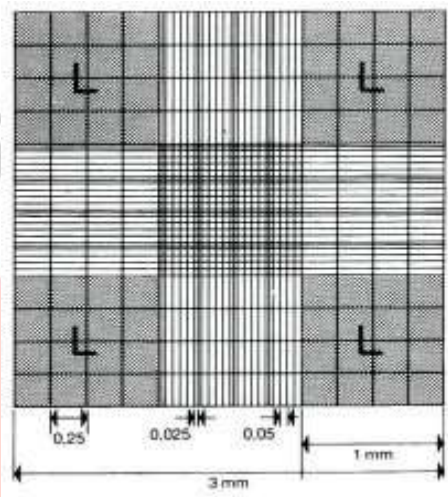
Ada beberapa jenis bilik hitung tapi yang sering digunakan adalah bilik hitung yang menggunakan garis bagi '*Improved Neubauer*' (Gambar 3.1). salah satu contoh

Riki Ahmad Taufik, 2014

Pengaruh Pemberian Maserat Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia lamk.*) Dan Lamanya Perawatan Pasca Perlakuan Terhadap Kualitas Sperma Mencit (*Mus musculus l.*) Galur Swiss Webster Universitas Pendidikan Indonesia | [repository.upi.edu](http://repository.upi.edu) | [perpustakaan.upi.edu](http://perpustakaan.upi.edu)



bilik hitung lain adalah *Original Neubauer* (Gambar 3.2). perbedaan dengan Improved Neubauer adalah pada Bidang besar yang letaknya ditengah–tengah. 25 bidang untuk Improved Neubauer dan 16 bidang untuk Neubauer



**Gambar 3.1.** *Original Neubauer*  
(Sumber: <http://lldata.wiessoft.de>)

#### e. 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 (Ashfahani, *et al.*, 2008; Yatim, 1994).

#### f. Pengamatan Kecepatan Sperma

Pengamatan kecepatan spermatozoa dilakukan dengan cara menghitung waktu yang diperlukan oleh 1 ekor sperma untuk menempuh 8 kotak ( $200\ \mu\text{m}$ ) *Hemacytometer Neubauer*. Setiap pengamatan kecepatan sperma dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan, yang berasal dari sperma yang bergerak lurus (Ashfahani, *et al.*, 2008).

Riki Ahmad Taufik, 2014

*Pengaruh Pemberian Maserat Daun Jati Belanda (Guazuma ulmifolia lamk.) Dan Lamanya Perawatan Pasca Perlakuan Terhadap Kualitas Sperma Mencit (Mus musculus l.) Galur Swiss Webster*  
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

### g. Pengamatan Abnormalitas Sperma

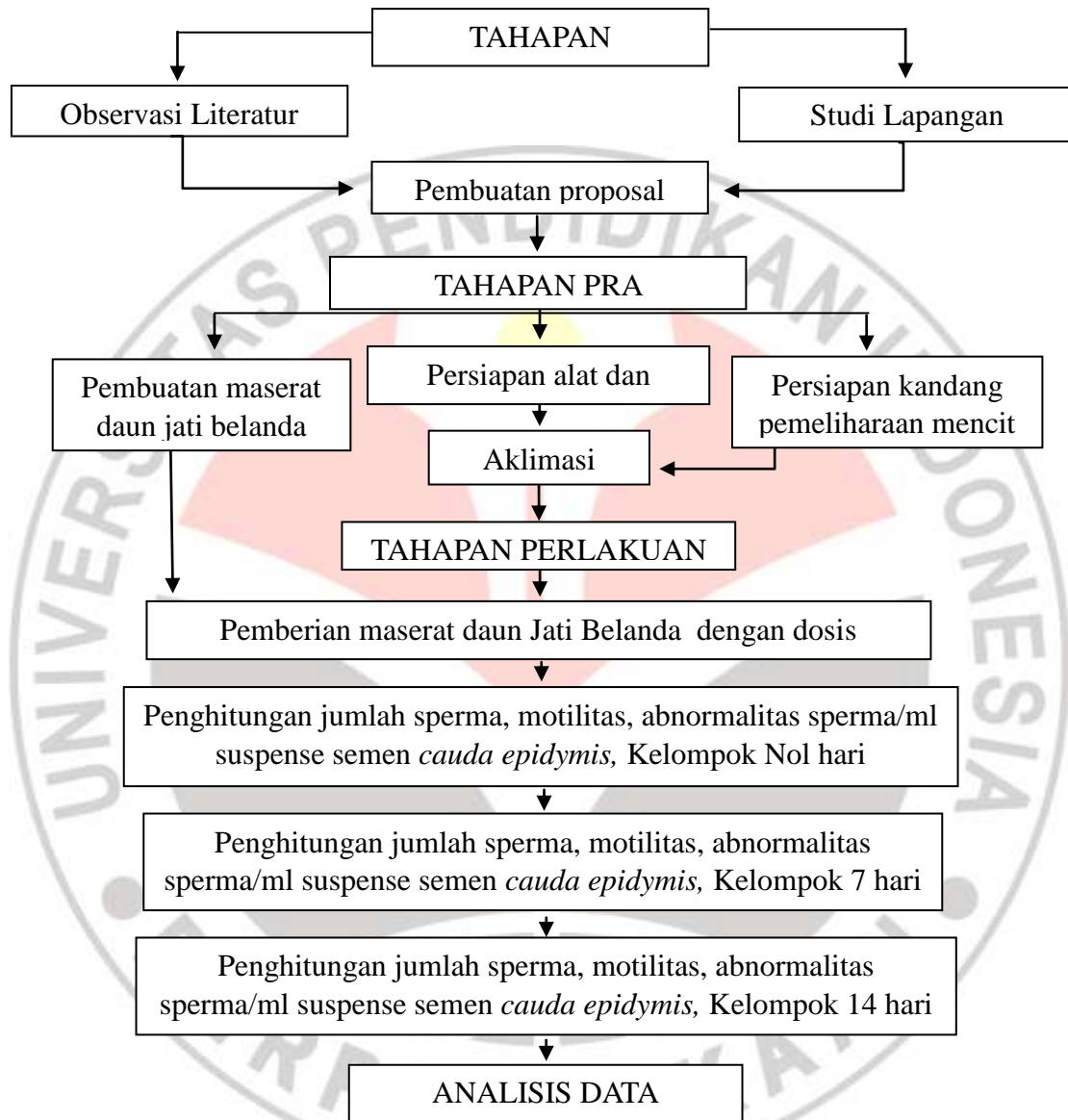
Pengamatan abnormalitas sperma dilakukan dengan cara mengamati morfologi sperma dari lima bidang pandang *haemocytometer* pada setiap preparat dengan mikroskop binokuler pada pembesaran 400x. Kemudian dilakukan pengamatan jumlah spermatozoa abnormal lalu menghitung persentase (%) jumlah sperma abnormal 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 *dismear* menggunakan kaca objek bersih dengan kemiringan 45°. Kemudian hasil *smear* didiamkan kering pada suhu ruang kemudian ditetesi dengan alkohol 96%, setelah itu dibiarkan mengering. Setelah kering, hasil *smear* diwarnai dengan menggunakan eosin 1%, kemudian dibiarkan mengering serta dibilas dengan menggunakan akuades. Setelah itu preparat ditetesi minyak emersi dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

### G. Analisis Data

Data yang didapatkan diuji homogenitas dan normalitasnya. Uji normalitas menggunakan uji *Test of Normality (Kolmogorov-Smimov)* 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 (*ANOVA*). Data yang memiliki perbedaan signifikan untuk setiap perlakuan kemudian diuji lebih lanjut dengan uji wilayah perbandingan berganda *Tukey HSD<sup>a</sup>*. Data yang tidak berbeda signifikan tidak diuji lebih lanjut dengan uji *Tukey HSD<sup>a</sup>*  $\alpha$  0,05 pada selang kepercayaan 95%. Analisis data menggunakan *Software SPSS 17 for Windows*.

## H. Alur Penelitian



**Gambar 3.2.** Alur Penelitian