

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 3 bulan, yaitu bulan Januari sampai Maret 2012. Pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di rumah hewan percobaan Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. Penghitungan jumlah spermatozoa, morfologi viabilitas spermatozoa dan motilitas spermatozoa dilakukan di Laboratorium Histologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan sebagai hewan coba yang berumur 8-9 minggu dari strain BALB/C dengan rentang berat badan 25-28 g sebanyak 30 ekor yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya, larutan 2-ME murni yang diproduksi oleh *Waco Pure Chemical Industries Japan*, aquades, ekstrak kecambah kacang hijau, larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%), pewarna Eosin 1% dan Nigrosin 10%,

3.2.2 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat pemeliharaan berupa bak plastik dengan penutup dari kawat kasa dan botol minuman, alat-alat

untuk perlakuan berupa botol-botol kecil tempat larutan yang akan dicobakan, *disposable syringe* 1 ml, alat bedah, bak bedah, pipet tetes, cawan petri, gelas obyek, gelas penutup, *hand counter* merk KW-triO 2410, cawan petri, mikroskop merk *Olympus*, mikrometer okuler, timbangan merk *Shimadzu* AY220, gelas ukur, micropipet, dan *rotary evaporator*.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan larutan 2-ME

Pada penelitian ini menggunakan larutan 2-ME dengan dosis 200 mg/kg berat badan (bb) (Anjarsari, 2006). Larutan ini dibuat dengan melarutkan 2-ME murni ke dalam aquades steril. Berat jenis air adalah 1,00 g/ml dan berat jenis 2-ME adalah 0,965 g/ml. Berat jenis air : berat jenis 2-ME = 1,00 : 0,965 = 1,036 ~1,04. Sehingga untuk pergram berat badan diberikan (200 mg: 1000 g) x 1,04 = 0,208 mg/g berat badan. Misalkan berat mencit yang digunakan adalah 25 g, maka 2-ME yang diperlukan adalah :

$$\frac{25}{1000} \times 0,208 \text{ mg/g berat badan} = 0,005 \text{ ml.}$$

Senyawa 2-ME yang diinjeksikan secara intraperitoneal adalah 0,05 ml, maka aquades yang dibutuhkan adalah 0,05 ml – 0,005 ml = 0,045 ml.

3.3.2 Pembuatan ekstrak etanolik kecambah kacang hijau

Cara pembuatan kecambah yaitu dengan merendam biji kacang hijau dengan air selama satu malam, kemudian ditebarkan pada tempat yang

mempunyai lubang dan diberi daun/kain/kertas merang sebagai substrat untuk menjaga kelembaban agar tidak busuk. Setiap hari kacang disiram dengan air sebanyak 4-5 kali. Setelah satu hari germinasi akan dihasilkan kecambah dengan panjang sekitar satu sentimeter, setelah dua hari akan mencapai sekitar empat sentimeter. Kecambah yang digunakan adalah kecambah yang berumur 48 jam yang dihitung sejak keluarnya *radicle* dan *plumule* dari kulit biji (Kamil, 1979).

Untuk membuat ekstrak kecambah kacang hijau, digunakan kecambah kacang hijau (*Phaseolus radiatus*) yang berumur 48 jam. Kecambah disiapkan dan ditimbang sebanyak 1 kg dan dikering anginkan sampai kering. Kecambah yang kering dihaluskan dengan blender sehingga didapatkan serbuk kecambah. Lalu serbuk kecambah direndam dengan etanol 90 % sebanyak 1 L selama satu malam. Fraksi etanol dipisahkan dari serbuk kecambah yang telah direndam dengan cara disaring. Dilakukan evaporasi etanol dengan menggunakan *rotary evaporator* selama 2 hari dan hasilnya berupa ekstrak kecambah. Berdasarkan Arifatin (1999) dalam Pidada dan Suhargo (2008), hasil yang diperoleh adalah ekstrak etanol yang mengandung senyawa-senyawa non polar dan polar.

3.3.3 Penentuan dosis ekstrak kecambah kacang hijau

Menurut Zakaria (2000) dalam Winarsi (2007), kandungan vitamin E dalam kecambah kacang hijau adalah 1,53 mg per 10 g. Proses ekstraksi akan menyisakan 10% dari berat awal dengan jumlah kandungan vitamin E yang tetap, sehingga dapat disimpulkan bahwa 1,53 mg vitamin E terdapat dalam 1 g ekstrak

kecambah kacang hijau (Aditya, 2010). Dosis vitamin E yang dianjurkan untuk dikonsumsi oleh manusia yaitu 10 mg perhari (Almatsier,2001).

$$1 \text{ g ekstrak kecambah kacang hijau} = 1,53 \text{ mg vitamin E}$$

$$1 \text{ mg vitamin E} = 1/1,53 \text{ g ekstrak kecambah kacang hijau}$$

$$\begin{aligned} 10 \text{ mg vitamin E} &= 10 \times 1/1,53 \text{ g ekstrak kecambah kacang hijau} \\ &= 6,5 \text{ g ekstrak kecambah kacang hijau.} \end{aligned}$$

Jadi dosis 10 mg vitamin E terdapat pada 6,5 g ekstrak kacang hijau.

Dosis ekstrak kecambah kacang hijau untuk mencit:

$$= 0,0026 \times 6,5 \text{ g ekstrak kecambah kacang hijau}$$

$$= 0,016 \text{ g} \approx 0,02 \text{ g} = 20 \text{ mg ekstrak kecambah kacang hijau}$$

Jadi dosis ekstrak kecambah kacang hijau yang akan diberikan ke mencit adalah 20 mg/ 20 g berat badan = 1 g/kg berat badan.

Dosis yang akan diberikan ke mencit adalah setengah dari dosis, dosis penuh, dan dua kali dosis, yaitu: 0,5 g/kg berat badan, 1 g/kg berat badan dan 2 g/kg berat badan

3.3.4 Pengelompokan dan perlakuan hewan coba

Mencit jantan dewasa yang berumur 8-9 minggu, dengan rentang berat badan 25-28 g sebanyak 30 ekor dikelompokkan menjadi 5 kelompok, yang terdiri atas 2 kelompok kontrol yaitu kontrol negatif (Kn) dan kontrol positif (Kp) dan 3 kelompok perlakuan (P1,P2, dan P3). Mencit dipelihara di kandang, diberi pakan berupa pelet dan air minum secara *ad libitum*. Sebelum perlakuan mencit di aklimatisasi terlebih dahulu selama 1 minggu. Perlakuan dilakukan pada pagi hari

pukul 09.00-10.00 WIB. Larutan 2-ME disuntikan melalui intraperitoneal, aquades dan ekstrak kecambah kacang hijau diberikan melalui *gavage*.

Tiga puluh ekor mencit dikelompokkan menjadi 5 kelompok, tiap kelompok terdiri atas 6 ekor yaitu:

Kn : diberi aquades 0,1 ml selama 40 hari.

Kp : diberi 2-ME dosis 200 mg/kg berat badan satu kali sehari selama 5 hari, kemudian diberi aquades 0,1 ml selama 35 hari.

P1 : diberi 2-ME dosis 200 mg/kg berat badan satu kali sehari selama 5 hari, kemudian diberi ekstrak kecambah kacang hijau 0,5 g/kg berat badan selama 35 hari.

P2 : diberi 2-ME dosis 200 mg/kg berat badan satu kali sehari selama 5 hari, kemudian diberi ekstrak kecambah kacang hijau 1 g/kg berat badan selama 35 hari.

P3 : diberi 2-ME dosis 200 mg/kg berat badan satu kali sehari selama 5 hari, kemudian diberi ekstrak kecambah kacang hijau 2 g/kg berat badan selama 35 hari.

3.3.5 Pengambilan spermatozoa

Mencit dikorbankan dengan cara dislokasi leher. Mencit dibedah di bagian bawah abdomen dan diambil testis beserta epididimis. Dalam larutan NaCl 0,9% 1 ml epididimis bagian cauda dipisahkan dari testis dan dibersihkan dari lemak yang melekat sampai bersih, kemudian cauda epididimis sepanjang 0,5 cm

dicacah dalam 1 ml larutan NaCl 0,9% dengan menggunakan gunting dan scalpel sampai terbentuk suspensi sperma.

3.3.6 Penghitungan jumlah spermatozoa

Jumlah spermatozoa dihitung dengan menggunakan bilik hitung *Improved Neubauer* (hemositometer). Suspensi spermatozoa sebanyak 1 ml yang telah diencerkan dalam larutan NaCl 0,9% di ambil 10 μ l, kemudian diletakkan ke dalam bilik hitung (hemositometer) lalu ditutup dengan kaca penutup. Jumlah spermatozoa dihitung di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Pengulangan pengamatan atau penghitungan dilakukan sebanyak sepuluh kali.

Bilik hemositometer yang digunakan adalah bilik yang besar (ada 4 bilik: atas kiri dan kanan, bawah kiri dan kanan). Masing-masing bilik terdiri atas 16 kotak kecil (bujur sangkar). Jumlah spermatozoa yang dihitung adalah rata-rata jumlah spermatozoa yang ada di bilik-bilik tersebut yang dilambangkan dengan huruf L.

Perhitungan jumlah spermatozoa per ml adalah sebagai berikut:

$$\text{Volume tiap bujur sangkar} = \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{10} = \frac{1}{160} \text{ mm}^3$$

$$\text{Volume tiap bilik} = 16 \times \frac{1}{160} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l} = 10^4$$

Untuk per 1 ml maka harus $\times 10^4$:

$$\text{Jumlah spermatozoa} = L \times 10^4 \times \text{faktor pengenceran}$$

3.3.7 Pengamatan morfologi spermatozoa

Pengamatan persentase morfologi spermatozoa dilakukan dengan membuat smear suspensi spermatozoa. Satu tetes spermatozoa diteteskan di satu ujung gelas obyek, kemudian diberi 1 tetes Eosin 1% dan 1 tetes Nigrosin 10%, kemudian dihomogenkan dan dibuat hapusan dan dikering anginkan selama 2-4 menit. Sebanyak 100 sel spermatozoa diamati morfologinya (%) dibawah mikroskop cahaya 400x, dengan pengulangan pengamatan sepuluh kali. Morfologi tidak normal spermatozoa meliputi kelainan pada kepala, leher dan ekor. Kriteria-kriteria kelainan morfologi adalah sebagai berikut :

Kepala : kepala mengecil, tidak memiliki kepala, kepala membesar, memiliki 2 kepala.

Leher : leher patah

Ekor : ekor melingkar, ekor patah, memiliki 2 ekor

Spermatozoa immature : spermatozoa yang masih mengandung *cytoplasmic droplet* yang masih terikat pada bagian kepala, ekor, atau leher (Soehadi & Arsyad, 1982).

3.3.8 Pengamatan dan penghitungan viabilitas spermatozoa

Untuk mengamati viabilitas spermatozoa, menggunakan hapusan spermatozoa yang telah ditetesi oleh 1 tetes pewarna Eosin 1% dan 1 tetes Nigrosin 10%. Viabilitas spermatozoa diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Spermatozoa yang berwarna merah menunjukkan spermatozoa yang mati dan sebaliknya yang tidak berwarna adalah yang masih hidup.

Penghitungan persentase viabilitas spermatozoa dilakukan pada 100 sel spermatozoa mencit, dengan pengulangan sebanyak sepuluh kali.

3.3.9 Pengamatan kecepatan motilitas spermatozoa

Suspensi spermatozoa diambil satu tetes dengan menggunakan pipet kemudian diteteskan ke dalam gelas obyek cekung dan ditutup dengan gelas obyek. Pengukuran kecepatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x yang telah dipasang mikrometer pada lensa okulernya. Jarak gerakan setiap spermatozoa diamati tiap 10 detik. Kecepatan motilitas ($\mu\text{m}/\text{detik}$) diperoleh setelah melakukan perhitungan dengan mengkonversi nilai skala mikrometer pada lensa okuler dan lensa obyektif. Jumlah spermatozoa yang dihitung sebanyak 100 sel.

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian eksperimental ini dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Pembagian kelompok hewan coba dilakukan secara acak tanpa memberikan kriteria khusus pada kelompok tertentu.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel-variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Variabel terikat (*dependent variable*): jumlah, morfologi normal dan tidak normal, viabilitas dan kecepatan motilitas spermatozoa mencit.

2. Variabel bebas (*independent variable*): dosis ekstrak kecambah kacang hijau.
3. Variabel terkontrol: umur, strain mencit, berat badan, pakan, minum, dosis 2-ME, lama waktu pemberian 2-ME dan lama waktu pemberian ekstrak kecambah kacang hijau.

3.6 Pengumpulan Data

Data diperoleh dengan menghitung jumlah, persentase morfologi, viabilitas dan kecepatan motilitas spermatozoa mencit, selanjutnya data ditabulasikan ke dalam tabel pengumpulan data.

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data statistik atau inferensial. Pada data yang diperoleh tersebut dilakukan uji Kolmogorov-Smirnov untuk mengetahui apakah data berdistribusi secara normal. Kemudian dilakukan uji ANOVA satu arah untuk mengetahui adanya pengaruh nilai *mean* antar kelompok perlakuan. Selanjutnya dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk mengetahui perbedaan *mean* antar kelompok perlakuan.