

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan, perlakuan, pengamatan jumlah, morfologi, viabilitas, dan motilitas spermatozoa terhadap hewan coba dilaksanakan di rumah hewan, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya. Penelitian dilaksanakan selama 2 bulan, bulan Januari sampai dengan Februari 2012.

3.2 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus* L.) jantan strain BALB C sebanyak 30 ekor dengan berat badan antara 23-27 g dan berumur 8-9 minggu. Mencit diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA), Surabaya.

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah larutan 2-ME murni produksi WAKO *Pure Chemical Industries Ltd.* Jepang, *aquades*, biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dari pasar Sokosari Tuban Jawa Timur, etanol 70%, kloroform, larutan NaCl 0,9 %, pewarna Eosin 1% dan Negrosin 10%, pakan mencit Par L produksi Comfed.

3.3.2 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: alat-alat pemeliharaan berupa bak plastik dengan penutup dari kawat kasa dan botol minuman, *disposable syringe*, timbangan, alat bedah, bak bedah, alat bius, pipet tetes, cawan petri, objek glass dan penutupnya, obyek glass cekung, *hand counter*, mikroskop cahaya, mikrometer, gelas hemositometer.

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian eksperimental ini dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL).

3.5 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdiri atas 3 variabel, yaitu:

- variabel bebas : dosis ekstrak biji labu kuning
- variabel terikat : jumlah, morfologi, viabilitas dan kecepatan motilitas spermatozoa mencit jantan
- variabel kendali : strain, berat badan hewan coba, pakan, minum, lama waktu pemberian 2-ME, dosis pemberian 2-ME.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan larutan 2-Metoksietanol

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. Cara membuat larutan dengan dosis 200 mg/kg BB dengan berat jenis air 1,00 g/mg dan berat jenis 2-ME 0,965 g/mL yaitu berat jenis air : berat jenis 2-ME = $1,00:0,965=1,036$ sehingga larutan 2-ME yang diberikan tiap 1 g mencit adalah $200 \text{ mg}/1000 \text{ g} \times 1,04 = 0,208 \text{ mg/g BB}$.

Mencit yang digunakan untuk percobaan mempunyai berat badan antara 23-27 g. Misal berat mencit yang digunakan 26 gram maka berat 2-ME yang diperlukan = $26/1000 \times 0,208 \text{ mg/g BB} = 0,005 \text{ mL}$.

Senyawa 2-ME yang diinjeksikan secara intraperitoneal adalah 0,05 mL maka aquades yang dibutuhkan adalah 0,045 mL

3.6.2 Pembuatan ekstrak etanol biji labu kuning (*Cucurbita moschata*)

Prosedur untuk mendapatkan ekstrak etanol biji labu kuning sebagai berikut:

1. Menimbang biji labu kuning sebanyak 1000 g.
2. Menyiapkan dan mengeringkan biji labu kuning dalam suhu kamar.
3. Menghaluskan dengan blender biji labu kuning kemudian didapatkan serbuk biji.
4. Merendam serbuk biji labu kuning dengan etanol 70% selama 72 jam.
5. Memisahkan fraksi etanol dari serbuk biji labu kuning yang telah direndam dengan cara disaring.
6. Melakukan evaporasi etanol dengan menggunakan *rotary evaporator* dan hasilnya berupa ekstrak biji labu kuning yang kental.

3.6.3 Penentuan dosis ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*)

Menurut (Widowati *et al.*, 2008), kandungan mineral Zn dalam biji labu kuning adalah 1,3 mg per 20 g sehingga sama dengan 6,5 mg per 100 g. Proses ekstraksi akan menyisakan 10% dari berat awal dengan jumlah kandungan mineral Zn yang tetap, sehingga dapat disimpulkan bahwa 0,65 mg mineral Zn terdapat dalam 1 g ekstrak biji labu kuning. Dosis mineral Zn yang dianjurkan untuk dikonsumsi oleh manusia yaitu 5 mg perhari (Allen, 1998 dalam Santoso, 2009).

1 g ekstrak biji labu kuning = 0,65 mg mineral Zn

1 mg mineral Zn = $1/0,65$ g ekstrak biji labu kuning

5 mg mineral Zn = $5 \times 1/0,65$ g ekstrak biji labu kuning.

= 7,65 g ekstrak biji labu kuning.

Jadi dosis 5 mg mineral Zn terdapat pada 7,65 g ekstrak biji labu kuning.

Dosis untuk mencit:

= $0,0026 \times 7,65$ g ekstrak biji labu kuning

= 0,0198 g = 0,02 g = 20 mg ekstrak biji labu kuning

Dosis yang akan diberikan ke mencit adalah setengah dari dosis, dosis penuh, dan dua kali dosis, yaitu: 10, 20, dan 40 mg/20 g BB (0,5; 1; 2 g/kg BB).

3.6.4 Pengelompokan dan perlakuan hewan coba

Mencit sebanyak 30 ekor diaklimatisasi selama 7 hari serta diberi makan dan minum secara *ad libitum* di rumah hewan, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya kemudian dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan. Setiap perlakuan terdiri atas 6 ekor mencit.

Perlakuan dilakukan per oral dengan menggunakan *disposable syringe* 1 mL yang ujungnya telah diberi kanul dan injeksi melalui intraperitoneal. Perlakuan dilakukan pada pagi hari pukul 09.00-10.00 WIB selama 40 hari.

Kelompok perlakuan terdiri atas:

Kontrol negatif (K_0) : Enam ekor mencit diberi aquades 0,1 mL melalui *gavage* satu kali sehari selama 40 hari.

Kontrol positif (K_1) : Enam ekor mencit diinjeksi 0,05 mL 2-ME 200 mg/kg melalui intraperitoneal satu kali sehari selama 5 hari, kemudian dilanjutkan dengan pemberian aquades 0,1 mL melalui *gavage* satu kali sehari selama 35 hari.

Perlakuan 1 (P_1) : Enam ekor mencit diinjeksi 0,05 mL 2-ME 200 mg/kg melalui intraperitoneal satu kali sehari selama 5 hari, kemudian dilanjutkan dengan pemberian ekstrak biji labu kuning 0,5 g/kg BB melalui *gavage* satu kali sehari selama 35 hari.

Perlakuan 2 (P_2) : Enam ekor mencit diinjeksi 0,05 mL 2-ME 200 mg/kg melalui intraperitoneal satu kali sehari selama 5 hari, kemudian dilanjutkan dengan pemberian ekstrak biji labu kuning 1,0 g/kg BB melalui *gavage* satu kali sehari selama 35 hari.

Perlakuan 3 (P_3) : Enam ekor mencit diinjeksi 0,05 mL 2-ME 200 mg/kg melalui intraperitoneal satu kali sehari selama 5 hari, kemudian dilanjutkan dengan pemberian ekstrak biji

labu kuning 2,0 g/kg BB melalui *gavage* satu kali sehari selama 35 hari.

3.6.5 Pengambilan spermatozoa

Pengambilan spermatozoa dilakukan setelah hewan dikorbankan, yaitu dengan cara membius mencit dengan menggunakan kloroform hingga mencit tersebut pingsan. Mencit ditelentangkan di papan bedah dan dibedah bagian abdomen, kemudian diambil epididimis bagian kauda dengan panjang 1/3 akhir dari panjang total epididimis (panjang epididimis kauda yang digunakan 0,5 cm). Epididimis bagian kauda dibersihkan dari lemak sampai bersih, kemudian dicacah menggunakan gunting dan scalpel dalam 1 mL larutan garam fisiologis (NaCl 0,9 %) sampai terbentuk suspensi spermatozoa.

3.6.6 Penghitungan jumlah spermatozoa

Jumlah spermatozoa dihitung dengan menggunakan bilik hitung *improved Neubauer* (hemositometer). Suspensi spermatozoa yang telah diencerkan dengan 1 mL larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%) diambil 10 μ L kemudian diletakkan ke dalam bilik hitung (hemositometer), setelah itu ditutup dengan gelas penutup. Pada saat menutup dengan gelas penutup gelembung udara tidak boleh terbentuk. Hemositometer yang telah berisi suspensi spermatozoa kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 x yang dilakukan sebanyak 10 kali. Spermatozoa yang dihitung adalah spermatozoa yang terletak di bagian tengah dan tepi bilik (sebelah atas dan kiri bilik), sedangkan spermatozoa yang terletak di tepi bilik bagian kanan dan bawah tidak dihitung. Rata-rata jumlah

spermatozoa (n) diperoleh dari total penjumlahan spermatozoa yang ada di setiap bilik dibagi menjadi 4. Panjang setiap bilik adalah 1 mm dan tinggi 0,1 mm, sehingga volume bilik = $0,1 \text{ mm}^3$ ($1,0 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$). Sehingga jumlah spermatozoa dihitung dengan rumus jumlah sel/mL = jumlah spermatozoa (n) x 10^4 x pengenceran.

Penghitungan jumlah spermatozoa per ml adalah sebagai berikut:

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

$$\begin{aligned} \text{Volume tiap bilik} &= 16 \times 1/160 = 0,1 \text{ mm}^3 \\ &= 10^4 \text{ mL} \end{aligned}$$

Untuk per 1 mL maka harus x 10^4

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

(Bijanti *et al.*, 2002; Soehadi dan Arsyad, 1982; Wirawan *et al.*, 1988).

3.6.7 Pengamatan morfologi spermatozoa

Pengamatan morfologi spermatozoa mencit dilakukan dengan cara membuat *smear* suspensi spermatozoa. Satu tetes spermatozoa mencit ditetaskan di satu ujung gelas objek, kemudian diberi 1 tetes eosin 1 % dan 1 tetes negrosin 10 %. Gelas objek yang lain diletakkan di ujung yang lain dari gelas objek yang pertama dengan membentuk sudut 45° , kemudian digerakkan sampai menyentuh tetesan sperma. Jika sperma telah mengalir rata di tepi dari gelas objek kedua, gelas objek kedua digerakkan kembali ke arah semula sehingga terbentuk lapisan tipis hapusan sperma di gelas objek pertama. Hapusan sperma dikeringanginkan pada suhu kamar selama kurang lebih 5 menit. Pengamatan morfologi

spermatozoa mencit dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran mulai dari yang kecil yaitu 40 x dilanjutkan dengan perbesaran 100 x dan perbesaran 400 x. Pengamatan dilakukan pada 100 spermatozoa (%) dengan replikasi pengamatan sebanyak 10 kali untuk setiap mencit (Dostal *et al.*, 2001). Pengamatan morfologi spermatozoa dibedakan atas spermatozoa normal dan abnormal yang dinyatakan dalam persen. Spermatozoa dikatakan normal apabila bagian kepala melengkung seperti kait, leher lurus dan ekor tunggal berujung bebas. Sedangkan morfologi abnormal bila kepala kecil atau terlalu besar, leher patah atau bercabang, ekor bercabang, menggulung dan patah, terdapat *sitoplasma droplet* pada kepala, leher atau ekor.

3.6.8 Pengamatan dan penghitungan viabilitas spermatozoa

Pengamatan dan penghitungan viabilitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan preparat hapusan spermatozoa yang diwarnai dengan eosin 1 % dan negrosin 10 %. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 x. Penghitungan viabilitas spermatozoa dilakukan pada 100 sel spermatozoa (%) dengan replikasi pengamatan sebanyak 10 kali untuk setiap mencit (Dostal *et al.*, 2001). Viabilitas dapat diketahui dengan adanya perbedaan warna pada sel spermatozoa. Spermatozoa yang masih hidup berwarna terang sedangkan spermatozoa yang mati memiliki warna ungu.

3.6.9 Pengamatan kecepatan motilitas spermatozoa

Pengamatan kecepatan motilitas spermatozoa diamati dengan cara suspensi spermatozoa diambil satu tetes dengan menggunakan pipet tetes kemudian ditetaskan ke dalam gelas objek cekung dan ditutup dengan gelas

penutup. Pengamatan kecepatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 x yang telah dipasang mikrometer pada lensa okulernya. Kecepatan motilitas spermatozoa dihitung setiap 10 detik pada 100 spermatozoa untuk tiap ekor mencit (Kamiya *et al.*, 2003).

3.7 Pengumpulan Data

Data diperoleh dengan menghitung jumlah, persentase morfologi normal, persentase viabilitas, dan rata-rata kecepatan motilitas spermatozoa.

3.8 Analisis Data

Untuk menguji atau mengetahui apakah data berdistribusi secara normal maka perlu dilakukan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Uji ANOVA satu arah dipergunakan untuk mengetahui perbedaan *mean* antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan signifikansi $P < 0,05$. Jika dari hasil uji ANOVA terdapat perbedaan pengaruh perlakuan ($P < 0,05$) terhadap jumlah, morfologi normal, viabilitas dan dan kecepatan motilitas spermatozoa, maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) untuk mengetahui bermakna atau tidaknya perbedaan antar pasangan perlakuan (Steel dan Torrie, 1991)