

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Rumah Hewan Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya sebagai tempat pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba. Laboratorium Genetika Molekuler Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi untuk pembuatan serbuk jamur dan ekstrak kasar PSK, isolasi dan pemurnian serta pengamatan kualitas spermatozoa. Penelitian ini dilaksanakan selama 6 bulan, yaitu pada bulan Januari 2012 sampai Juni 2012.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Hewan coba

Penelitian ini menggunakan 24 ekor mencit jantan jenis *Mus musculus* strain Balb/C, berumur 8-10 minggu, berat badan sekitar 25-30 gram yang diperoleh dari Instalansi Kandang Hewan Percobaan (IKHP) Pusvetma Surabaya.

3.2.2 Bahan penelitian

Jamur *Coriolus versicolor* yang dikoleksi dari daerah Lamongan, Surabaya, Jombang dan Sidoarjo dengan ciri-ciri memiliki bentuk setengah lingkaran dengan diameter 3-5 cm, pipih, tipis, dan keras, permukaan bagian atas beludru dan memiliki zona konsentris atau bagian tengah yang menarik dengan berbagai warna. Pada proses penentuan konsentrasi PSK bahan yang digunakan adalah akuades, *phenol*, dan larutan H₂SO₄. Bahan yang digunakan untuk

pengamatan kualitas spermatozoa adalah garam fisiologis, akuades, *ethanol* 70%, *negrosin* 10%, *eosin* 1% dilarutkan kedalam 100 ml akuades. Pada proses pemeliharaan digunakan pakan berupa pelet *hi pro vite*.

3.2.3 Alat penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian ini antara lain kandang berupa bak plastik berukuran 30 x 13 x 19 cm dengan tutup dari kawat kasa, peralatan bedah, jarum injeksi ukuran 24G, *disposable syringe* 1 ml, cawan petri, timbangan analitik, gelas ukur, mikroskop cahaya, mikroskop cahaya, *hand counter*, *haemositometer* asisten, gelas objek cekung, gelas objek, *stop watch*.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Tahap koleksi dan pembuatan serbuk jamur *Coriolus versicolor*

Tubuh buah dari jamur *Coriolus versicolor* dikoleksi dari daerah Lamongan, Surabaya, Jombang dan Sidoarjo. Jamur ini ditemukan pada bongkahan kayu yang telah mati dan tumbuh saat musim hujan. Jamur yang telah diperoleh diidentifikasi, kemudian dicuci dengan air sampai bersih kemudian dikeringkan. Selanjutnya, jamur dipotong kecil-kecil lalu dimasukkan dalam oven pada suhu 40⁰ C selama 24 jam untuk menghilangkan kandungan airnya. Setelah 24 jam, jamur dihaluskan dengan cara digiling sampai menjadi serbuk kasar.

3.3.2 Tahap pembuatan ekstrak jamur *Coriolus versicolor*

Pembuatan ekstrak jamur *Coriolus versicolor* dilakukan menurut metode Cui dan Christi (2003) dalam Wahyuningsih dkk. (2009) dengan cara sebagai berikut: serbuk kasar sebanyak 200 gram ditambah air sebanyak 3 liter dan dipanaskan pada suhu 80⁰-98⁰ C selama 2-3 jam untuk melarutkan polisakarida.

Kemudian, supernatan disaring dengan menggunakan saringan. Selanjutnya disaring lagi menggunakan kertas saring. Residu yang ada diambil untuk diekstrak lagi sebanyak 2 kali ekstraksi dengan penambahan air sebanyak 2 liter untuk tiap ekstraksi dan dipanaskan pada suhu 80° - 98° C selama 2 jam. Hasil yang didapat berupa supernatan dari ketiga ekstraksi \pm 2 liter dan disimpan dalam suhu 4° C.

3.3.3 Tahap isolasi polisakarida krestin (PSK)

Isolasi polisakarida krestin dilakukan menurut Cui dan Christi (2003) dan Wahyuningsih dkk (2009) dengan cara sebagai berikut: larutan ekstrak jamur difiltrasi menggunakan kertas *Whatman* no.41 dengan corong *buchner* dan vakum kemudian diambil supernatannya. Supernatan diliofilisasi menggunakan *freeze drying*, untuk 150 ml dilakukan liofilisasi selama \pm 24 jam. Kemudian serbuk kering ekstrak jamur dipresipitasi menggunakan ammonium sulfat 90% dengan menimbang 30 gram ammonium sulfat yang dilarutkan dalam akuades 50 ml kemudian diresuspensi menggunakan mikropipet. Kemudian dilakukan penambahan ekstrak jamur kering sebanyak 1 gram kemudian distirer selama \pm 20 menit pada suhu 4° C selanjutnya disentrifus (9000 rpm/40 menit, 4° C) dan diambil peletnya. Pelet dilarutkan dengan 30 ml garam fisiologis selanjutnya didialisis menggunakan membran nitroselulosa selama 24 jam di dalam PBS pada suhu 4° C.

3.3.4 Tahap penentuan konsentrasi polisakarida krestin (PSK)

Pengukuran konsentrasi polisakarida krestin dengan *phenol-sulphuric acid* dilakukan menurut metode Wahyuningsih dkk (2009), dan didapatkan persamaan regresi linearnya $y = 0,008x + 0,002$, dengan y adalah nilai OD dan x adalah

konsentrasi polisakarida. Kemudian membuat larutan blanko yang berisi 100 μl akuades. Selanjutnya, membuat larutan sampel yang berisi ekstrak polisakarida krestin dari tubuh buah jamur *Coriolus versicolor* sebanyak 50 μl dan ditambah 50 μl akuades. Blanko dan larutan sampel ditambah 50 μl *phenol* 80%, lalu divorteks. Larutan tersebut masing-masing ditambah 2 ml H_2SO_4 . Kemudian dilakukan pembacaan nilai OD pada panjang gelombang 490 nm. Nilai OD yang dapat dimasukkan ke dalam persamaan regresi di atas untuk mendapat konsentrasi PSK.

3.3.5 Aklimasi hewan coba

Sebelum diberi perlakuan, hewan coba dipelihara terlebih dahulu selama 7 hari untuk penyesuaian diri terhadap lingkungan rumah hewan (aklimasi).

3.3.6 Pemeliharaan

Pemeliharaan mencit dilakukan dalam rumah hewan yang dilengkapi dengan rak-rak kandang atau *air conditioning*. Kandang mencit berupa bak plastik yang ditutupi dengan kawat kasa dan diberi alas sekam, dilengkapi dengan botol minum dan tempat makan. Pemberian makan dilakukan setiap hari sedangkan pemberian minum diberikan secara *adlibitum*.

3.3.7 Perlakuan

Semua pemberian PSK dilakukan dengan dosis tunggal secara peroral atau *gavage* setiap hari selama 62 hari kemudian diamati hasilnya. Perlakuan dan kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. P0 : kelompok kontrol, mencit diberi akuades sebagai kontrol normal
2. P1 : kelompok perlakuan, mencit diberi PSK dengan dosis 1,5 mg/kg BB

3. P2 : kelompok perlakuan, mencit diberi PSK dengan dosis 3 mg/kg BB
4. P3 : kelompok perlakuan, mencit diberi PSK dengan dosis 6 mg/kg BB

Dengan perhitungan yang sudah dikonversikan kepada rerata berat badan mencit yaitu 30 gram maka pada kelompok P1 diberi PSK sebesar 0,045 mg, P2 diberi PSK sebesar 0,09 mg dan P3 diberi PSK sebesar 0,18 mg

3.3.8 Koleksi spermatozoa

Koleksi spermatozoa dilakukan dengan cara bagian epididimis dipisahkan dari lemak dan testis. Untuk mengurangi terjadinya kontaminasi oleh cairan darah dan jaringan lainnya, dengan hati-hati epididimis dibersihkan dan diambil bagian kauda epididimisnya yakni diambil pada bagian yang dekat dengan vas defferens. Kemudian kauda epididimis diletakkan dalam cawan petri yang berisi 1 ml garam fisiologis. Spermatozoa mencit dikoleksi dengan metode cacah.

3.3.9 Pengukuran motilitas spermatozoa

Pengukuran motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara meletakkan satu tetes suspensi spermatozoa dalam gelas objek cekung dengan kaca dengan skala mikrometer diletakkan pada lensa objektif. Kecepatan motilitas spermatozoa diketahui dengan mengukur jarak yang ditempuh oleh spermatozoa tiap detik ($\mu\text{m}/\text{detik}$) dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x yang pada lensa objektifnya sudah dipasang mikrometer sebagai skalanya. Pengamatan kecepatan motilitas spermatozoa dilakukan segera setelah pembedahan mencit dalam waktu kurang lebih 15-30 menit. Spermatozoa yang dipilih adalah yang bergerak lurus kedepan (*progressive*) pada lensa okuler

dengan perbesaran 400x. Pengamatan dilakukan pada 100 spermatozoa (Hayati, 2007).

3.3.10 Pengamatan viabilitas spermatozoa

Pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan dengan mengambil satu tetes suspensi spermatozoa, kemudian ditambahkan 2-3 tetes *eosin* 1% dan *negrosin* 10% di atas gelas objek. Suspensi zat pewarna dihomogenkan dan dibuat *smear*, dibiarkan selama 5-10 menit, kemudian dilihat viabilitas spermatozoa dengan menggunakan mikroskop (Hayati, 2007). Pengamatan viabilitas dilakukan pada 100 spermatozoa per preparat dengan ulangan 10 x dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Data pengamatan tersebut meliputi spermatozoa yang hidup dan spermatozoa yang mati. Pada kepala spermatozoa, bila tidak terwarnai berarti spermatozoa tersebut masih hidup dan yang mati pada daerah kepala berwarna merah (terwarnai). Kepala berwarna merah karena zat warna *eosin* dan *negrosin* menembus masuk dalam membran sel. Masuknya *eosin* dan *negrosin* disebabkan oleh permeabilitas membran sel spermatozoa mati meningkat di daerah kepala yang tidak tertutup akrosom (Hadiningsih, 2010).

3.3.11 Pengamatan morfologi spermatozoa

Pengamatan morfologi spermatozoa dilakukan dengan mengambil satu tetes suspensi spermatozoa, kemudian diteteskan 2-3 tetes *eosin* 1% dan *negrosin* 10% di atas gelas objek. Suspensi zat pewarna dihomogenkan dan dibuat *smear*, dibiarkan selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir secara pelan. Setelah itu dikering anginkan pada suhu kamar (Hayati, 2007).

Pengamatan morfologi dilakukan pada 100 spermatozoa per preparat dengan ulangan 10 x dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Data pengamatan tersebut meliputi bentuk morfologi normal dan abnormal, kemudian dinyatakan dalam persen (%). Spermatozoa mempunyai morfologi normal apabila kepala bulat lonjong dengan bagian atas anterior lebih membulat dari posterior, leher lurus dan ekor tunggal berujung bebas. Morfologi abnormal jika kepala lebih kecil, lebih besar, memanjang, tidak ada atau sedikit area akrosom, mempunyai dua kepala satu ekor, leher lebih tebal, lebih kecil, bengkok, ekor bengkok, pendek, melingkar dan patah serta adanya sisa sitoplasma yang melekat (*cytoplasmic droplet*) pada kepala, leher atau ekor (Hafez dan Hafez, 2005).

3.3.12 Perhitungan jumlah spermatozoa

Jumlah spermatozoa dihitung dengan metode dari Hayati (2007), suspensi spermatozoa sebanyak 1 ml diletakkan diatas gelas *heamositometer*, kemudian ditutup dengan kaca penutup. Jumlah spermatozoa mencit yang dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Jumlah spermatozoa dihitung dengan menggunakan cara sebagai berikut: suspensi spermatozoa yang telah diencerkan dengan 1 ml (1×10^3 ml) larutan garam fisiologis diambil 10 μ l kemudian diletakkan kedalam kamar hitung (*heamositometer*). Terbentuknya gelembung udara dihindari pada saat menutup kamar hitung dengan gelas penutup. Spermatozoa yang dihitung adalah spermatozoa yang terletak dibagian tengah dan tepi bilik (sebelah atas dan kiri bilik), sedangkan spermatozoa yang terletak di tepi bagian kanan dan bawah tidak dihitung. Rata-rata jumlah

spermatozoa (n) diperoleh dari total penjumlahan spermatozoa disetiap bilik dibagi empat. Panjang setiap bilik adalah 1 mm dan tinggi 0,1 mm, sehingga volume bilik sama dengan $0,1 \text{ mm}^3$ atau $1,0 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$ atau $1,0 \times 10^{-4} \text{ ml}$. Jumlah spermatozoa dihitung dengan rumus jumlah sel/ml = jumlah spermatozoa (n) $\times 10^4 \times$ faktor pengenceran.

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pada enam kelompok perlakuan, untuk memperoleh jumlah ulangan menggunakan rumus sebagai berikut:

Keterangan: $t(n-1) \geq 15$
 t = jumlah perlakuan
 n = jumlah ulangan

dimana,

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

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 20$$

$$n \geq 5$$

(Kusriningrum, 2008)

Hasil dari penghitungan rumus di atas, maka diperoleh nilai minimal 5 kali ulangan pada setiap perlakuan. Pada penelitian ini menggunakan 6 kali ulangan.

3.8 Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang akan diamati adalah:

1. Variabel bebas (*independent variable*), yaitu dosis polisakarida krestin.
2. Variabel terikat (*dependent variable*), yaitu kecepatan motilitas, persentase viabilitas, persentase morfologi normal, dan jumlah spermatozoa.

3. Variabel terkendali, yaitu *Mus musculus* jantan strain Balb/c, berumur 8-10 minggu, berat badan sekitar 25-30 gram, jenis pakan, air minum dan waktu perlakuan.

3.9 Cara Memperoleh Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini yaitu berupa data kuantitatif kecepatan motilitas ($\mu\text{m/detik}$), viabilitas (%), morfologi normal (%) dan jumlah spermatozoa (sel/ml).

3.10 Analisis Data

Analisis data secara kuantitatif dengan cara melakukan serangkaian uji statistik. Semua data terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Apabila data yang diperoleh normal dan homogen dapat dilanjutkan uji parametrik Anova satu arah pada taraf uji $\alpha = 0,05$. Bila dari hasil uji Anova terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji beda jarak dengan menggunakan uji Duncan.