

### **BAB 3 METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian dilakukan pada bulan September-Oktober 2019 di Laboratorium Hewan Coba Universitas Airlangga untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba. Untuk pemeriksaan motilitas dan viabilitas spermatozoa hewan coba dilakukan di Laboratorium Departemen Inseminasi Buatan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang mencit beserta penutup dari kawat sebanyak 4 unit dengan ukuran panjang 40 cm, lebar 30 cm, dan tinggi 12 cm, tempat pakan, botol minum mencit, disposable spuit 1 ml, mikroskop cahaya, kertas label, seperangkat alat bedah, obyek glass, *cover glass*, dan alat tulis.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit sebanyak 20 ekor umur tiga bulan dengan berat antara 20 gram. Litter sebagai alas, air minum, NaCl 0,9%, nikotin yang didapatkan dari RTS USA dengan kandungan 100 mg/ml, dan larutan *hydro-osmotic test* (HOS Test).

### 3.3 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan Acak Lengkap digunakan karena unit eksperimental bersifat homogen. Perlakuan dilakukan secara acak dengan empat perlakuan dan lima kali ulangan. Jumlah perlakuan dan ulangan dibuat berdasarkan rumus Federer (1991), yaitu  $t(n-1) \geq 15$

Perlakuan (t) : 4

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4.75 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}$$

Satuan percobaan :  $4 \times 5 = 20$  mencit jantan yang homogen. Maka jumlah mencit yang digunakan adalah 20 ekor mencit.

#### 3.3.2 Persiapan Kandang dan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit jantan (*Mus musculus*). Hewan uji didapatkan dari Pusat Veteriner Farma (PUSVETMA) Surabaya. 4 Kandang mencit beserta penutupnya sebanyak 4 unit dibersihkan dan diberi alas

berupa litter. 20 ekor mencit jantan disiapkan dalam kondisi yang fertil, berumur 10 minggu, dan berat 20 gram. Mencit kemudian diadaptasi selama 1 minggu dengan diberi pakan berupa pelet dan air minum setiap harinya. Adaptasi ini bertujuan agar mencit melakukan penyesuaian kondisi dengan lingkungan sekitar.

### **3.3.2 Perhitungan Dosis**

Perhitungan dosis pada penelitian ini didasarkan pada penelitian Rahmawati bahwa pemberian injeksi nikotin sebesar 5 mg/kgBB/hari dapat menurunkan jumlah sel spermatosit dalam tubulus seminiferus. Untuk perhitungan lebih jelas dapat dilihat pada lampiran 1.

### **3.3.4 Pemberian Perlakuan**

Mencit diberi nikotin setiap hari selama 35 hari pada jam yang sama menggunakan spuit dengan cara injeksi secara subkutan pada bagian belakang leher. Dosis yang diberikan pada setiap perlakuan adalah sebagai berikut:

K : Diinjeksi NaCl 0.5 ml selama 35 hari.

P1: Mencit diinjeksi nikotin 2,5 mg/kgBB/hari selama 35 hari.

P2: Mencit diinjeksi nikotin 5 mg/kgBB/hari selama 35 hari.

P3: Mencit diinjeksi nikotin 10 mg/kgBB/hari selama 35 hari.

### 3.3.5 Pembuatan Larutan HOS

Pemeriksaan *hypo-osmotic swelling test* (HOS Test) memerlukan larutan dengan tekanan osmosis yang rendah. Larutan HOS dibuat dengan mencampurkan Na Sitrat 0,735 g, fruktosa 1,351 g, dan aquadest 100 ml. Larutan HOS dengan tekanan osmosis yang rendah dapat memasuki spermatozoa. Apabila membran plasma spermatozoa rusak maka larutan HOS akan keluar kembali. Larutan HOS tidak dapat keluar dari spermatozoa apabila membran dalam kondisi yang baik.

### 3.3.6 Pembuatan Sampel Spermatozoa

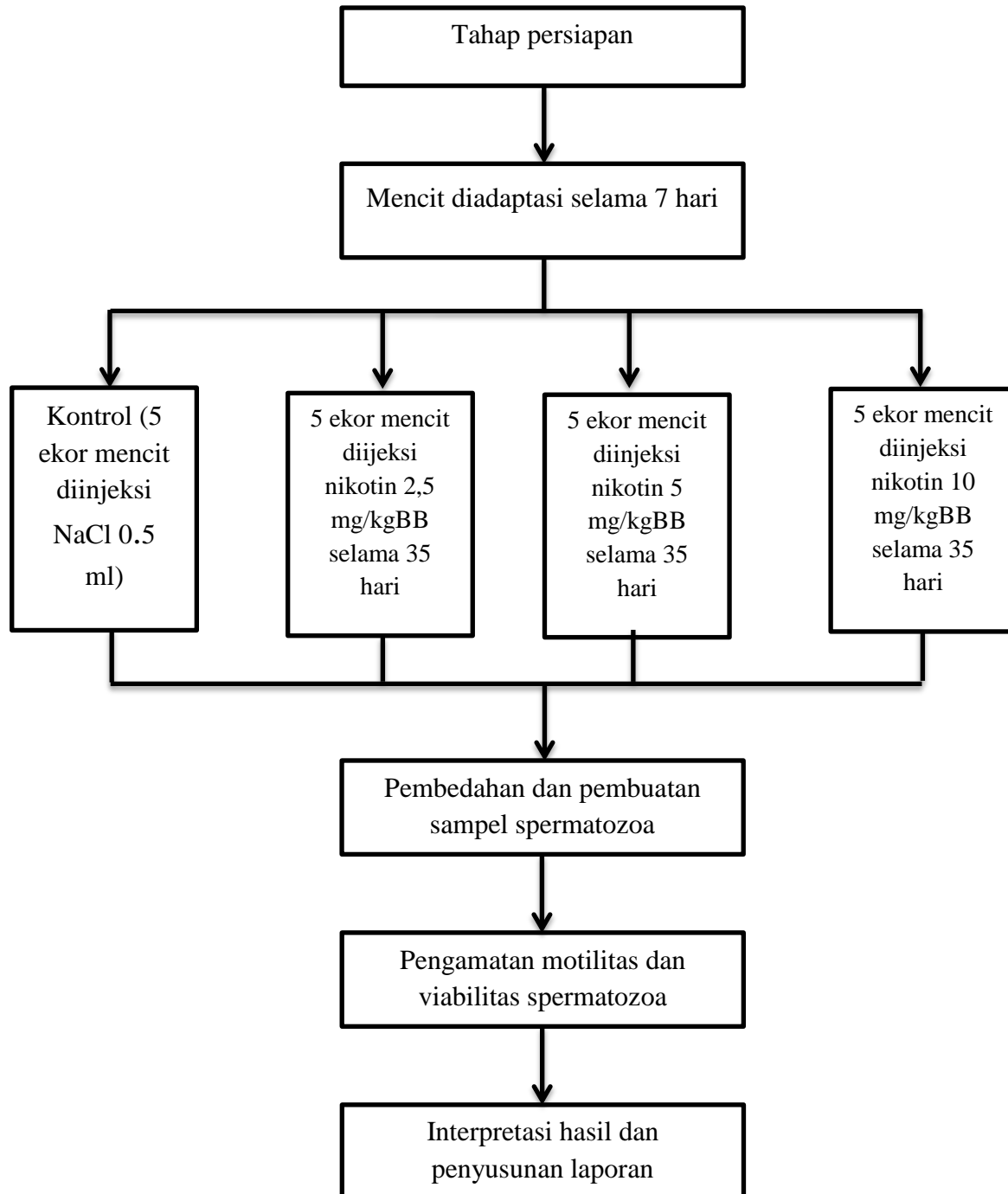
Setelah 35 hari perlakuan, mencit dieuthanasi dengan cara dislokasi cervicalis dan dibedah untuk diambil organ testis dan cauda epididimis dengan menginsisi pada dinding abdomen. Selanjutnya testis dan epididimis dikeluarkan dan dipisahkan dengan memotong bagian proximal corpus epididimis dan bagian distal vas defferens. Cauda epididimis yang sudah terpisah selanjutnya diletakkan pada cawan petri berisi 1 ml NaCl 0.9%. Proximal cauda epididimis dipotong sedikit dan ditekan hingga spermatozoa keluar lalu kemudian diaduk sehingga terbentuk suspensi spermatozoa. Suspensi siap digunakan untuk pemeriksaan. Pemeriksaan motilitas spermatozoa cukup dengan meneteskan satu tetes suspensi spermatozoa pada *object glass* lalu ditutup dengan *cover glass* dan diamati dibawah mikroskop. Pemeriksaan viabilitas dilakukan dengan memberikan pewarna *eosin/negrosin* pada suspensi dan teteskan pada *object glass* lalu ditutup dengan *cover glass* kemudian diamati dibawah

mikroskop. HOS *test* dilakukan dengan menambahkan lautan HOS pada suspensi spermatozoa kemudia diinkubasi selama 30 menit sampai satu jam. Setelah itu ditambahkan pewarna *eosin/negrosin* dan dibuat preparat ulas.

### **3.3.5 Analisis Data**

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan empat perlakuan, yang masing – masing perlakuan dilakukan lima kali pengulangan. Data yang telah diperoleh dianalisis menggunakan *Analisis of Variance* (ANOVA). Apabila ada perbedaan nyata akan dilanjutkan menggunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5% sebagai perbandingan dari masing-masing perlakuan.

### 3.4 Diagram Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alur Penelitian