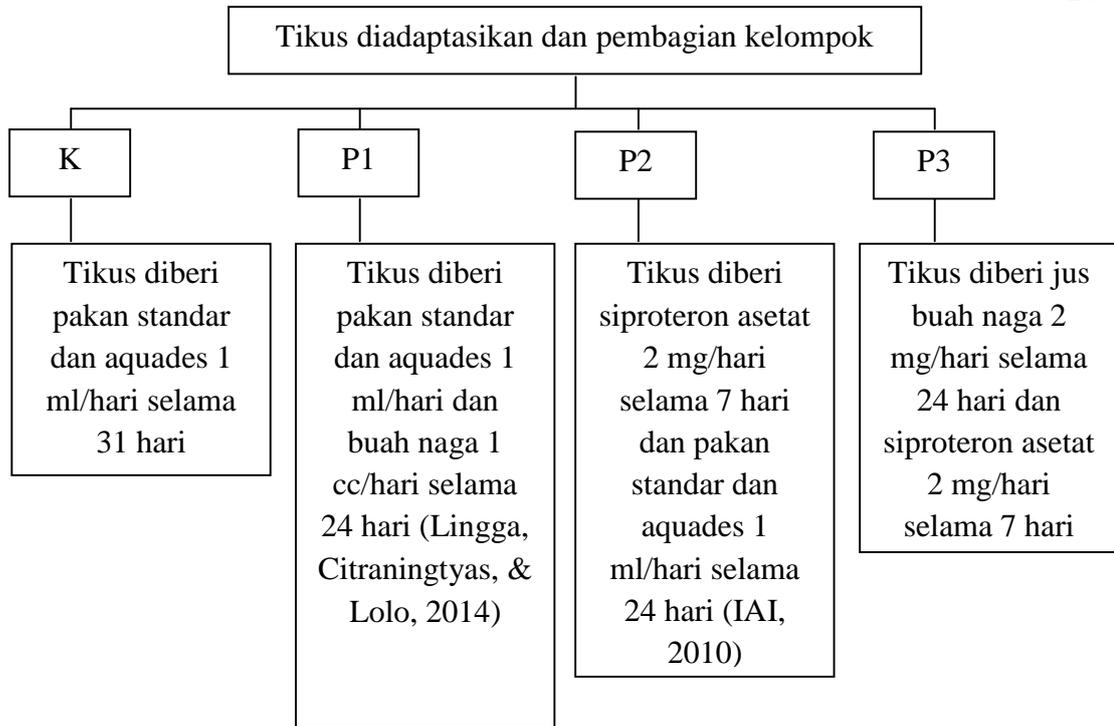


### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Desain yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian laboratorium dengan rancangan acak lengkap. Penelitian ini menggunakan 4 (empat) kelompok perlakuan terhadap hewan percobaan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague dawley*, terdiri atas 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Tikus dipilih sebagai objek penelitian karena memiliki homogenitas metabolik yang mirip manusia. Tikus putih memiliki organ dan fisiologi sistemik yang sama, serta memiliki gen yang mirip dengan manusia. Tikus putih juga memiliki kemiripan yang baik bagi patogenitas suatu penyakit. Kemiripan inilah yang menjadi salah satu alasan mengapa tikus putih digunakan dalam meneliti patogenitas penyakit maupun proses penuaan pada manusia (Olayaki *et al.*, 2008).



Gambar 5. Desain Penelitian

## B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di ruang penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada bulan September sampai dengan bulan November 2015. Pembedahan, pengamatan, perhitungan, dan pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

## C. Variabel Penelitian

### 1. Variabel Independen

Pemberian suplemen jus buah naga daging putih (*Hylocereus undatus*) dan induksi siproteron asetat

### 2. Variabel Dependen

Motilitas dan jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa

#### D. Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Suplemen jus buah naga putih ( <i>Hylocereus undatus</i> )	Daging buah naga putih ( <i>Hylocereus undatus</i> ) yang diblender tanpa menambahkan air	Sprit (1cc)	Kontrol : tidak diberi suplemen jus buah naga putih selama 24 hari Perlakuan 1: diberi jus buah naga putih selama 24 hari Perlakuan 2: tidak diberi suplemen jus buah naga putih selama 24 hari Perlakuan 3: diberi jus buah naga putih selama 24 hari	Jus buah naga diberikan secara tepat pada kelompok perlakuan 1 dan 3	Nominal
Siproteron asetat	Siproteron asetat dibuat menjadi puyer kemudian dilarutkan dalam akuades		Kontrol : tidak diinduksi siproteron asetat Perlakuan 1: tidak diinduksi siproteron asetat Perlakuan 2: diinduksi siproteron asetat Perlakuan 3: diinduksi siproteron asetat	Kelompok 3 dan 4 diinduksi siproteron asetat	Nominal
Motilitas spermatozoa	Motilitas spermatozoa meliputi arah dan kecepatan gerakan spermatozoa	Mikroskop	Menghitung jumlah spermatozoa yang bergerak dibandingkan dengan jumlah total spermatozoa	Persentase spermatozoa yang bergerak	Numerik
Jumlah spermatozoa	Jumlah spermatozoa merupakan jumlah populasi sel-sel spermatogenik.	Mikroskop dan Improved Neubauer (sel/ml)	Menghitung jumlah spermatozoa di kauda epididimis	Banyaknya jumlah spermatozoa	Numerik

## E. Alat dan Bahan Penelitian

### 1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan yaitu: botol yang tutupnya diberi pipa aluminium sebagai tempat minum tikus, mikroskop, pipet tetes, gelas objek, gelas penutup, kaca arloji, cawan petri, kandang tikus yang terdiri dari bak plastik yang ditutupi dengan kawat pada bagian atasnya sebanyak 4 kandang, blender, sonde lambung, spuit oral, toples plastik yang mempunyai tutup, kapas, seperangkat alat bedah (*dissecting set*), Improved Neubauer.

### 2. Bahan Penelitian

Adapun bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

- a. Bahan biologis: tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague dawley* umur 2-4 bulan dengan berat 100-200 gram dan sehat.
- b. Bahan kimia: suplemen jus buah naga putih (*Hylocereus undatus*) selama 24 hari, siproteron asetat dengan dosis 2 mg/hari selama 7 hari, pelet babi sebagai bahan makan tikus, alcohol murni 70-100%, NaCl 0,9%, methanol, pewarna giemsa dan aquades.

## F. Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini sampel terdiri dari 24 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague dawley* yang dibagi secara acak dalam 4 kelompok masing-masing 6 ekor di tiap kelompok dengan nama kontrol, P1, P2, dan P3

1. Kontrol: hanya diberikan 1 ml akuades
2. P1: diberi suplemen jus buah naga putih secara oral selama 24 hari

3. P2: diinduksi siproteron asetat dengan dosis 2 mg/hari selama 7 hari
4. P3 : diberi suplemen jus buah naga putih secara oral selama 24 hari dan kemudian diinduksi siproteron asetat dengan dosis 2 mg/hari selama 7 hari

### **G. Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi dari penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague dawley* usia 2-4 bulan dengan berat 100-200 gram dan sehat yang ditandai dengan gerakan aktif, diperoleh dari Palembang Tikus Center. Besar sampel ditentukan dengan menggunakan rumus Frederer dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Inklusi:

1. Sehat
2. Memiliki berat badan 100-200 gram
3. Jenis kelamin jantan
4. Usia sekitar 2-4 bulan

Eksklusi:

1. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah 1 minggu masa adaptasi di laboratorium
2. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak, dan aktivitas kurang atau tidak aktif)

Rumus besar sampel untuk uji eksperimental rancangan acak lengkap (RAL):

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

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini akan menggunakan 4 kelompok sehingga perhitungan sampel menjadi

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

$$n - 1 \geq 3,75$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \approx 5$$

Untuk mengantisipasi sampel yang *drop out* digunakan rumus *Drop Out* sebagai berikut:

$$N = \frac{n}{1 - f}$$

Dengan  $f = 10\%$

$$N = \frac{5}{1 - 10\%}$$

$$N = \frac{5}{0,9}$$

$$N = 5,56$$

$$N \approx 6$$

Jadi jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok adalah 6 ekor tikus putih dikalikan dengan empat perlakuan sehingga jumlah sampel adalah 24 ekor tikus putih. Dua puluh ekor tikus putih dibagi menjadi empat kelompok secara acak. Pembagian empat kelompok tikus putih, yaitu:

Kelompok 1 : 6 ekor (kontrol)

Kelompok 2 : 6 ekor (perlakuan)

Kelompok 3 : 6 ekor (perlakuan)

Kelompok 4 : 6 ekor (perlakuan)

## H. Prosedur Penelitian

### 1. Pemeliharaan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague dawley* umur 2-4 bulan dengan berat 100-200 gram dan sehat. Dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 0,5-1 cm dan diganti setiap hari untuk mencegah infeksi yang dapat terjadi akibat kotoran tikus tersebut. Dalam 1 kelompok, 6 ekor tikus ditempatkan dalam 1 kandang. Cahaya ruangan dikontrol persis 12 jam terang (pukul 06.00 sampai pukul 18.00 WIB), dan gelap 12 jam (18.00 sampai pukul 06.00 WIB), sedangkan suhu dan kelembaban ruangan dibiarkan berada dalam kisaran alamiah. Kandang ditempatkan dalam suhu kamar dan menggunakan cahaya matahari tidak langsung. Makanan hewan percobaan diberikan berupa pelet babi. Makanan dan minuman diberikan secukupnya dalam wadah terpisah dan diganti setiap hari. Setiap tikus diberi perlakuan sekali sehari yang dilakukan pada pagi hari selama 31 hari (Sukirti *et al.*, 2013)

### 2. Persiapan Hewan Uji Coba

Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan selama satu minggu di tempat pemeliharaan hewan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, tempat dilaksanakannya penelitian. Setiap tikus ditimbang berat badannya dan diamati kesehatannya secara fisik sebelum diberi perlakuan.

### 3. Penyediaan Buah Naga Putih dan Siproteron Asetat

Buah naga putih didapatkan dari pasar tradisional Bambu Kuning Bandar Lampung. Sedangkan siproteron asetat didapatkan dari Apotek Rosa Bandar Lampung

#### a. Prosedur pembuatan suplemen jus buah naga

Mula-mula daging buah naga putih dipisahkan dari kulitnya. Kemudian daging buah naga tersebut diblender tanpa menambahkan air.

#### b. Penentuan dosis siproteron asetat

Dosis siproteron asetat yang digunakan adalah 2 mg/hari

### 4. Pemberian Perlakuan

Setiap kelompok mempunyai perlakuan yang berbeda, yaitu:

- a. Kontrol: hanya diberikan 1 ml akuades
- b. Perlakuan 1: diberi suplemen jus buah naga putih secara oral selama 24 hari
- c. Perlakuan 2: diinduksi siproteron asetat dengan dosis 2 mg/hari selama 7 hari
- d. Perlakuan 3 : diberi suplemen jus buah naga putih secara oral selama 24 hari dan kemudian diinduksi siproteron asetat dengan dosis 10 mg/hari selama 7 hari (Zade *et al.* 2013).

## I. Pengamatan

Setelah 31 hari perlakuan, masing-masing hewan coba dianastesi kemudian dikorbankan dengan cara *servical dislocation* dan selanjutnya dibedah. Selanjutnya dilakukan pengamatan sebagai berikut:

## 1. Pengambilan Sekresi di Kauda Epididimis

Untuk mendapatkan spermatozoa di dalam sekresi kauda epididimis dilakukan menurut Soehadi dan Arsyad (1983) yaitu sebagai berikut: Setelah 31 hari perlakuan, masing-masing hewan coba dikorbankan dengan cara dipatahkan lehernya dan selanjutnya dibedah. Kemudian organ kauda epididimis diambil dan diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi NaCl 0,9%.

Selanjutnya kauda epididimis dimasukkan ke dalam gelas arloji yang berisi 1 ml NaCl 0,9%, kemudian bagian proksimal kauda dipotong sedikit dengan gunting lalu kauda ditekan dengan perlahan hingga cairan sekresi keluar dan tersuspensi dengan NaCl 0,9%. Suspensi spermatozoa dari kauda epididimis yang telah diperoleh dapat digunakan untuk pengamatan yang meliputi motilitas dan jumlah spermatozoa.

## 2. Perhitungan Motolitas Spermatozoa

Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan metode Partodiharjo (1992). Sperma tikus diambil dari bagian kauda epididimis dengan disayat dan dipencet perlahan. Satu tetes sperma ditempatkan pada gelas objek, ditambah satu tetes larutan fisiologis NaCl 0,9%, dicampur merata dan ditutup dengan *cover glass*. Persentase spermatozoa motil dihitung dalam satu luasan bidang pandang menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 kali dengan menaksir spermatozoa yang bergerak progresif dari keseluruhan lapangan pandang dari daerah taksir, kemudian dikali 100%. Penilaian dilakukan dengan menghitung persentase

spermatozoa yang bergerak dibandingkan dengan seluruh yang teramati (bergerak dan tidak bergerak) (Etuk & Muhammad, 2009)

$$\% \text{ motilitas} = \frac{\text{jumlah spermatozoa progresif} \times 100\%}{\text{total spermatozoa yang diamati}}$$

Biasanya empat sampai enam lapang pandang diperiksa untuk memperoleh seratus spermatozoa secara berurutan yang kemudian diklasifikasi (Wasito, 2008).

### 3. Perhitungan Jumlah Spermatozoa

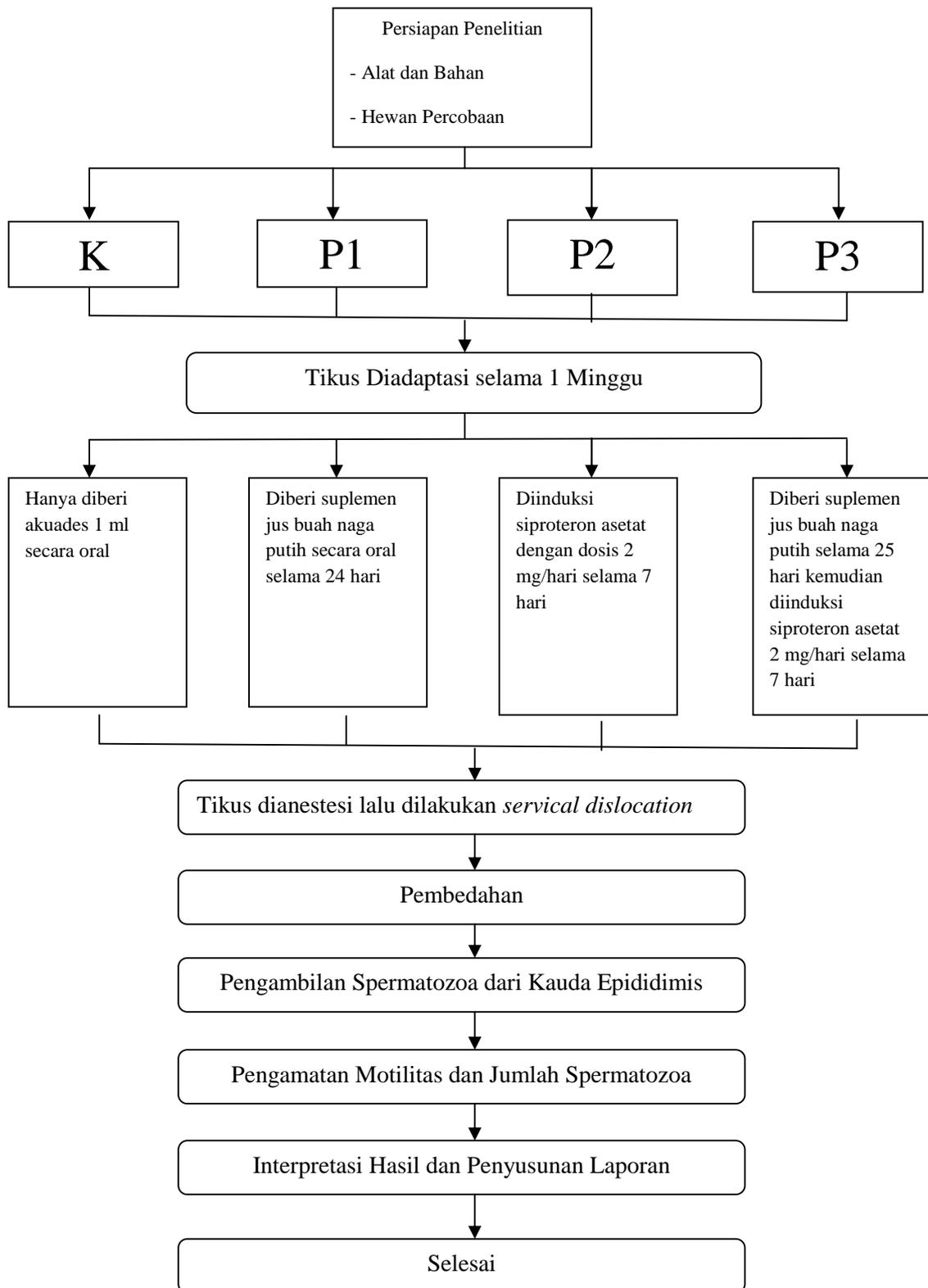
Suspensi spermatozoa yang telah diperoleh terlebih dahulu dihomogenkan, selanjutnya diambil sebanyak 10  $\mu$ l sampel dan dimasukkan ke dalam kotak-kotak hemositometer Improved Neubauer serta ditutup dengan kaca penutup. Di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 kali. Hemositometer diletakkan dan dihitung jumlah spermatozoa pada satu kotak bidang A, B, C, atau D. Hasil perhitungan jumlah spermatozoa kemudian dimasukkan ke dalam rumus penentuan jumlah spermatozoa/ml suspensi kauda epididimis sebagai berikut (Gandasoebrata, 1984)

$$\text{jumlah spermatozoa} = n \times 200.000 \text{ (juta/ml)}$$

Dimana n = jumlah spermatozoa yang dihitung pada kotak A, B, C, atau D

## **J. Analisis Data dan Uji Hipotesis**

Kelompok penelitian terdiri dari 4 kelompok yaitu 3 kelompok perlakuan dan 1 kontrol dalam 6 (ekor) kali pengulangan. Pada tiap kelompok, data yang terkumpul dianalisis menggunakan program SPSS Version 21.0.0.0 *for windows 64 bit* dengan menggunakan uji Anova untuk menguji perbedaan rerata pada kelompok perlakuan dan kelompok control. Hasil penelitian dianalisis secara statistic dengan uji normalitas (Shapiro-Wilk) dan homogenitas (Levene). Jika varian data distribusi normal serta homogen, maka dilanjutkan dengan metode *one way ANNOVA*. Hipotesis akan dianggap bermakna bila  $p < 0,05$ , maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc* LSD.



Gambar 6. Diagram Alur Penelitian

**K. Etika Penelitian**

Penelitian ini telah disetujui Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 2619/UN26/8/DT/2015 yang menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian.