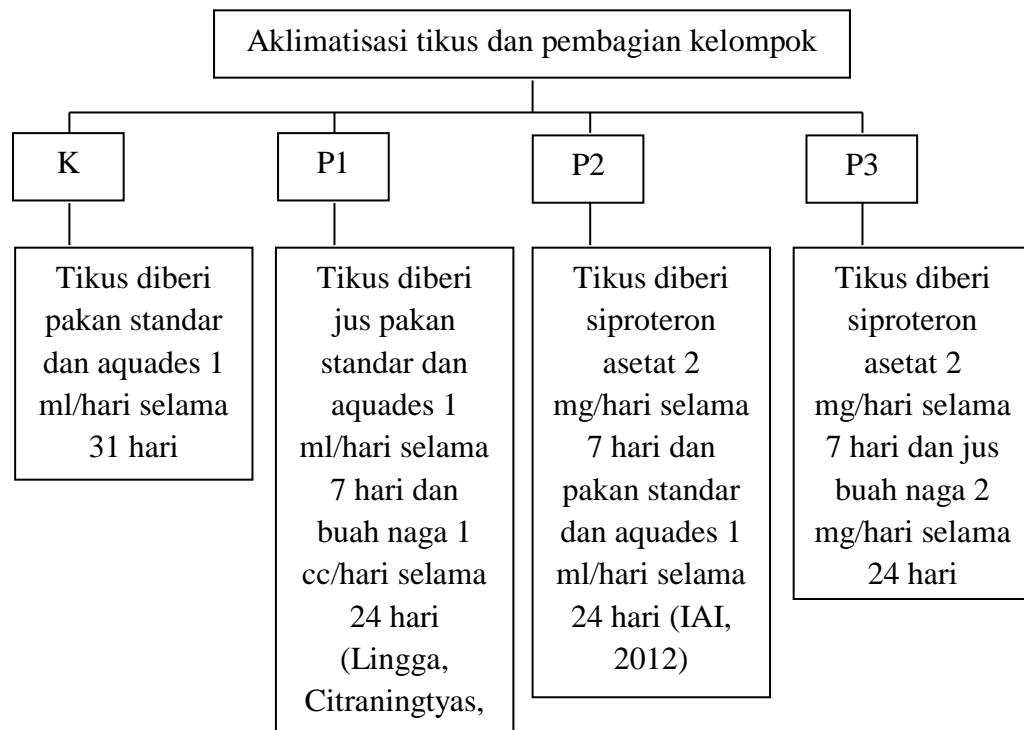


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Desain yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap. Penelitian ini menggunakan empat kelompok perlakuan terhadap hewan percobaan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*.



3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian meliputi pembedahan organ testis tikus, pembuatan preparat, dan pengamatan dilaksanakan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada bulan September hingga November 2015.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Independen

Suplemen jus buah naga putih (*Hylocereus undatus*) dan siproteron asetat.

3.3.2 Variabel Dependen

Motilitas, jumlah, dan morfologi spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague dawley*.

3.4 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No.	Variabel	Objek data	Keterangan
1	Suplemen jus buah naga putih (<i>Hylocereus undatus</i>)	Definisi Cara ukur Skala Alat ukur	Daging buah naga putih (<i>Hylocereus undatus</i>) yang diblender tanpa ditambah air Kontrol: tidak diberi suplemen jus buah naga putih 1 cc/hari selama 24 hari Perlakuan 1: diberi jus buah naga putih 1 cc/hari 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 Nominal Spuit

		Hasil ukur	Suplemen jus buah naga diberikan dengan sesuai pada kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 3
2	Jumlah spermatozoa	Definisi	Jumlah spermatozoa per ml
		Cara ukur	Dihitung jumlah spermatozoa yang diambil dari kauda epididimis lagi dan diletakkan di Improved Neubauer dan dihitung menggunakan mikroskop
		Skala	Numerik
		Alat ukur	Mikroskop dan Improved Neubauer
		Hasil ukur	Banyaknya jumlah sel spermatozoa
3	Morfologi spermatozoa	Definisi	Meliputi bentuk spermatozoa
		Cara ukur	Dilakukan dengan cara ambil larutan stok sebanyak ± 5 mikro liter (ul) larutan stok. Kemudian teteskan pada kaca objek. Buat hapusan dengan cara mendorong larutan tersebut dengan kaca objek lain ke depan. Biarkan mengering, fiksasi dengan alkohol 70 %, biarkan mengering selama 15 menit. Beri pewarnaan giemsa 5 mikro liter (ul) (merck chemical Co, Jerman) dan dibiarkan mengering selama 15 menit. Bilas dengan air mengalir dan dibiarkan kering. Amati dibawah mikroskop cahaya dalam beberapa lapangan pandang terhadap sperma yang abnormal, dengan pembesaran 400 kali
		Skala	Ordinal
		Alat ukur	Mikroskop
		Hasil ukur	Bentuk sel spermatozoa yang normal atau abnormal. Normal: memiliki bentuk kepala seperti kait pancing dan ekor panjang lurus. Abnormal: memiliki bentuk kepala tidak beraturan <i>amorphous</i> , berbentuk seperti pisang, atau terlalu bengkok dan ekor tidak lurus bahkan tidak berekor atau hanya terdapat ekornya saja tanpa kepala.
4	Motilitas spermatozoa	Definisi	Motilitas spermatozoa meliputi gerakan spermatozoa
		Cara ukur	Untuk menentukan motilitas spermatozoa diambil spermatozoa dari kauda epididimis seperti penjelasan di atas kurang lebih 10-15 μ l

	ke atas gelas objek dengan ukuran 25,4 mm x 76,2 mm lalu ditutup dengan cover glass 22 mm x 22 mm. Dilakukan pengamatan pada 5 lapang pandang pada pembesaran mikroskop 400x.
Skala	Ordinal
Alat ukur	Mikroskop
Hasil ukur	Gerakan spermatozoa dari kategori bergerak dan tidak bergerak.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan berupa pipet tetes, gelas objek, gelas penutup, kaca arloji, cawan petri, *improver neubauer*, kapas, spuit oral, toples plastik yang mempunyai tutup, seperangkat alat bedah, botol yang tutupnya diberi pipa alumunium sebagai tempat minum tikus, mikroskop, blender, kandang tikus yang terdiri dari bak plastik yang ditutupi dengan kawat pada bagian atasnya sebanyak 8 kandang.

3.5.2 Bahan Penelitian

1. Bahan biologis: tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur sprague dawley dewasa umur 2-4 bulan dengan berat 150-250 gram dan sehat.
2. Bahan kimia: suplemen jus buah naga putih (*Hylocereus undatus*) selama 24 hari, siproteron asetat dengan dosis 2 mg/hari selama 24

hari, pellet ayam sebagai bahan makan tikus, Metanol 70-100%, NaCl 0,9%, , zat warna Giemsa, dan aquades.

3.6 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini sampel terdiri dari 24 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 1 ml/hari peroral selama 24 hari.
3. P2: diberi Siproteron asetat dengan dosis 2 mg/hari selama 7 hari.
4. P3: diinduksi siproteron asetat dengan dosis 2 mg/hari secara oral selama 7 hari dan diberi buah naga putih 1 ml/hari secara oral selama 24 hari.

3.7 Populasi dan Sampel Penelitian

3.7.1 Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur Sparague Dawley usia 2-4 bulan dengan berat 150-200 gram dan sehat yang ditandai dengan gerakan aktif. Tikus diperoleh dari Palembang Tikus Center dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

1. Kriteria inklusi
 - a. Sehat
 - b. Memiliki berat badan 150-250 gram

- c. Jenis kelamin jantan
 - d. Usia sekitar 2-4 bulan
2. Kriteria eksklusi
- a. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah 1 minggu masa adaptasi di laboratorium
 - b. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak, dan aktivitas kurang atau tidak aktif)

3.7.2 Sampel

Besar ulangan ditentukan berdasarkan buku panduan penelitian WHO yaitu minimal 5 ekor tikus tiap kelompok dengan menggunakan rumus Frederer. Penelitian ini akan menggunakan 4 kelompok sehingga perhitungan sampel menjadi:

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

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

$$n-1 \geq 15$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \approx 5$$

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

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

Dengan $f = 10\%$

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

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

$$N = 5,56$$

$$N \approx 6$$

Keterangan:

t: kelompok perlakuan (4 kelompok)

n: jumlah pengulangan tiap kelompok

Jumlah pengulangan yang digunakan pada tiap kelompok penelitian adalah enam ekor tikus putih jantan dewasa. Jadi sampel total tikus yang digunakan dari perhitungan jumlah pengulangan dan banyak kelompok adalah 24 ekor. 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)

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pemeliharaan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur Sparague Dawley umur 2-4 bulan dengan berat 150-200 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 ayam. Makanan dan minuman diberikan secukupnya dalam wadah terpisah dan diganti setiap hari. Setiap tikus diberi perlakuan sekali sehari yang dilakukan pada pagi hari selama 24 hari.

3.8.2 Persiapan Hewan Uji Coba

Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan selama satu minggu di tempat pemeliharaan hewan lantai 3 gedung B Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, tempat dilaksanakannya penelitian. Setiap tikus

ditimbang berat badannya dan diamati kesehatannya secara fisik sebelum diberi perlakuan.

3.8.3 Penyediaan Buah Naga Putih dan Siproteron Asetat

Buah naga putih didapatkan dari pasar tradisional tugu Bandar Lampung. Sedangkan siproteron asetat dengan merk dagang Diane yang kandungannya siproteron asetat 2 mg dan etinil estradiol 0,035 mg, didapatkan dari Apotek Rossa Bandar Lampung

1. Prosedur pembuatan suplemen jus buah naga putih (*Hylocereus undatus*). Mula-mula daging buah naga putih dipisahkan dari kulitnya. Kemudian daging buah naga tersebut diblender tanpa menambahkan air. Satu buah naga putih (*Hylocereus undatus*) dengan berat satuannya 400 gram didapatkan volume bersih jus 320 ml per buahnya setelah diblender.
2. Penentuan dosis siproteron asetat/ Dosis yang diberikan adalah 2 mg/hari dengan satu kali pemberian.

3.8.4 Pemberian Perlakuan

Setiap kelompok mempunyai perlakuan yang berbeda, yaitu:

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

3. Perlakuan 2: diinduksi siproteron asetat dengan dosis 2 mg/hari dalam 1 ml air selama 7 hari.
4. Perlakuan 3: diinduksi siproteron asetat dengan dosis 2 mg/hari dalam 1 ml air selama 7 hari dan diberi suplemen jus buah naga putih 1 ml secara oral selama 24 hari.

3.8.5 Proses Pembedahan dan Pengambilan Spermatozoa

1. Pembedahan

Setelah 24 hari perlakuan, masing-masing hewan coba dikorbankan dengan cara mematahkan leher hewan coba. Mempersiapkan alat bedah (bak paraffin, gunting, pinset, jarum, gelas arloji) yang akan digunakan.

2. Pengambilan, Penimbangan dan Pengukuran Testis

Setelah selesai proses pembedahan, pengambilan bagian testis dengan menggunakan pinset. Kemudian meletaknya testis tikus pada gelas ukur berisi NaCl agar dapat dengan mudah memisahkan testis dengan lemak.

3.8.6 Pengamatan Motilitas, Jumlah, dan Morfologi Spermatozoa

Setelah 24 hari perlakuan, masing-masing hewan coba dikorbankan dengan cara dislokasi leher dan selanjutnya dibedah. Selanjutnya dilakukan pengamatan sebagai berikut.

1. Pengambilan Sekresi Kauda Epididimis

Untuk mendapatkan spermatozoa di dalam sekresi kauda epididimis dilakukan dislokasi leher setelah 24 hari perlakuan dan selanjutnya dibedah. Kemudian organ testis dan epididimis diambil dan diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi NaCl 0,9%.

Di bawah mikroskop bedah dengan pembesaran 400 kali kauda epididimis dipisahkan dengan cara memotong bagian proksimal korpus epididimis dan bagian distal vas deferens. 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 epididimis keluar dan tersuspensi dengan NaCl 0,9%. Suspensi spermatozoa dari cauda epididimis yang telah diperoleh dapat digunakan untuk pengamatan yang meliputi jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa.

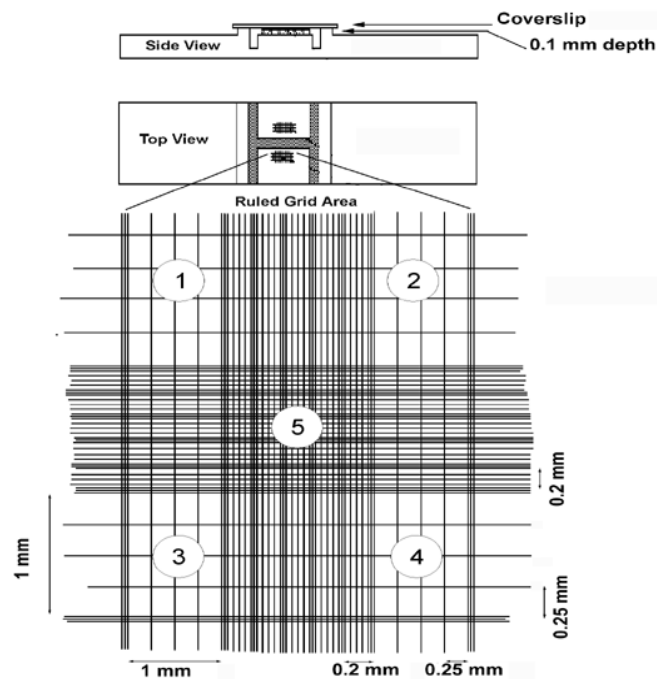
2. Perhitungan Jumlah Spermatozoa

Suspensi spermatozoa yang telah diperoleh terlebih dahulu dihomogenkan, selanjutnya diambil sebanyak 10 μ l sampel dan dimasukkan ke dalam kotak-kotak hemositometer improved neubauer serta ditutup dengan kaca penutup. Di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali, hemositometer diletakkan dan dihitung jumlah spermatozoa pada kotak atau bidang A, B, C, D, dan

E. hasil perhitungan jumlah spermatozoa kemudian dimasukkan ke dalam rumus penentuan jumlah spermatozoa/ml suspensi sekresi kauda epididimis sebagai berikut (Gandasoebrata R, 2007).

$$\text{Jumlah spermatozoa} = n \times \text{pengenceran} \times 10^5 \text{ spermatozoa/ml}$$

Dimana n = jumlah spermatozoa yang dihitung pada kotak A, B, C, D, dan E. Interpretasi hasil normal $\geq 38,4$ juta/ml.



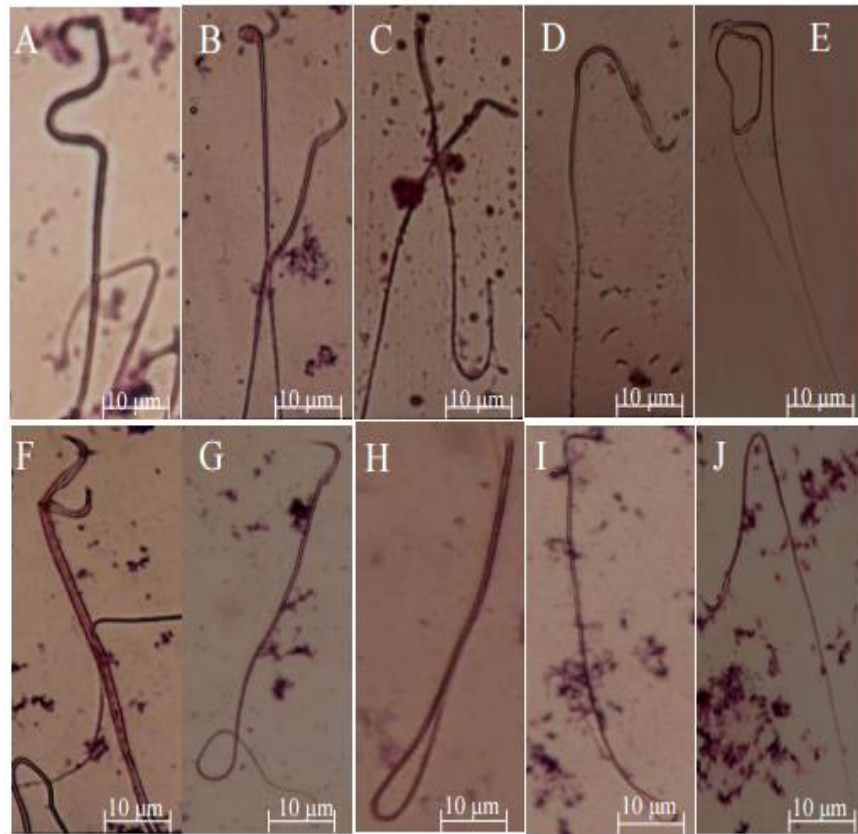
Gambar 4. Kamar Hitung Improved Neubauer (Heidcamp, 2002)

3. Morfologi spermatozoa

Untuk menentukan morfologi spermatozoa diambil spermatozoa dari kauda epididimis seperti penjelasan di atas, kemudian dibuat apusan

menggunakan kaca objek, lalu dikeringkan. Kemudian diberi alkohol 70% selama 15 menit dikeringkan kemudian diberi pewarna giemsa selama 15 menit. Setelah itu dibilas dengan aquades lalu dikeringkan. Kemudian di bawah mikroskop cahaya dihitung dengan jumlah 100 spermatozoa, ditentukan presentase spermatozoa normal dan abnormal (WHO). Untuk mendapatkan hasil akhirnya, jumlah persentase normal kiri dan kanan kauda epididimis dijumlah kemudian diambil rata-ratanya.

Ciri morfologi spermatozoa normal yaitu memiliki bentuk kepala seperti kait pancing dan ekor panjang lurus. Sedangkan morfologi spermatozoa abnormal yaitu memiliki bentuk kepala tidak beraturan *amorphous*, berbentuk seperti pisang, atau terlalu bengkok dan ekor tidak lurus bahkan tidak berekor atau hanya terdapat ekornya saja tanpa kepala.



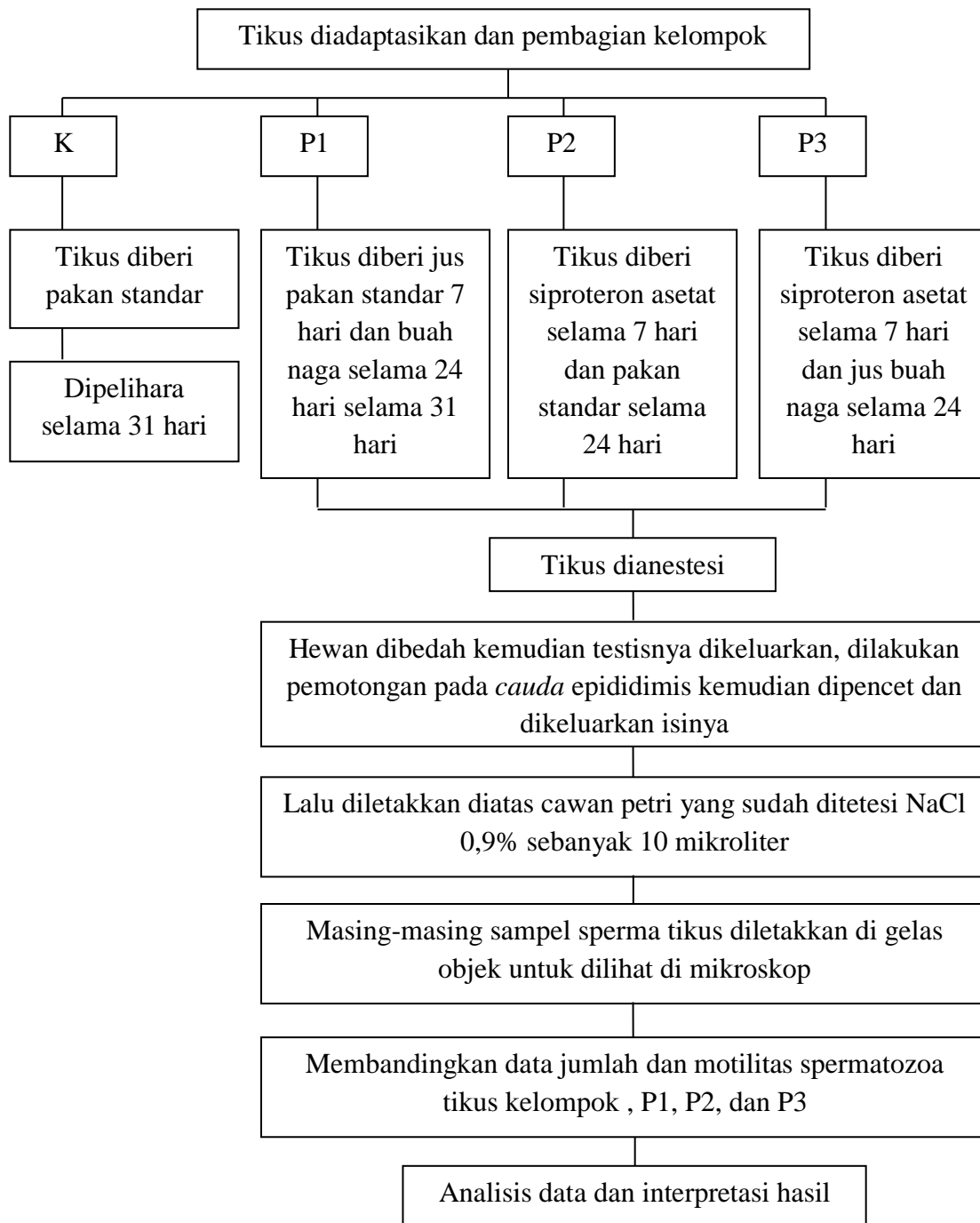
Gambar 5. A. Bagian tengah tebal dan melekuk; B. Kepala patah; C. Kepala dan bagian tengah yang mengandung sisa sitoplasma; D. Bagian tengah menebal; E. Ujung ekor dan kepala bertemu; F. Kepala ganda; G. Ekor melingkar; H. Kepala putus dan ekor melipat; I. Ujung ekor membentuk loop; J. Ekor bersudut (Harlis, 2011)

4. Motilitas spermatozoa

Untuk menentukan motilitas spermatozoa diambil spermatozoa dari kauda epididimis seperti penjelasan di atas kurang lebih 10-15 µl ke atas gelas objek dengan ukuran 25,4 mm x 76,2 mm lalu ditutup dengan cover glass 22 mm x 22 mm. dilakukan pengamatan pada 5 lapang pandang pada pembesaran mikroskop 400x.

Kategori perhitungan berdasarkan motilitas bergerak atau tidaknya spermatozoa tikus. Jika bergerak dimasukkan ke kategori a. Jika tidak bergerak dimasukkan ke kategori b.

Biasanya empat sampai enam lapangan pandang yang diperiksa untuk memperoleh seratus spermatozoa secara berurutan yang kemudian diklasifikasi sehingga menghasilkan persentase setiap kategori motilitas. Dikatakan normal bila $a > 50\%$ dan abnormal bila $a < 50\%$.



Gambar 6. Diagram Alur Penelitian

3.9 Analisa Data dan Pengujian Hipotesis

Kelompok penelitian terdiri dari empat kelompok yaitu tiga kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol. Pada tiap kelompok, data yang terkumpul dianalisis menggunakan SPSS 17.00 for Windows dengan menggunakan uji one way anova untuk menguji perbedaan rerata pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini telah disetujui Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dalam bentuk Surat Persetujuan Etik Nomor 2442/UN26/8/DT/2015 pada tanggal 26 November 2015 (Lampiran 1).