

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Desain yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan Rancangan Acak Terkontrol (RAT).

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

Pemeliharaan dan pemberian ekstrak cabe jawa dan zinc (Zn) pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dilaksanakan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada bulan akhir November sampai awal Desember 2012 selama 10 hari. Pembedahan organ testis tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dilaksanakan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung serta pembuatan preparat dan pengamatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

### C. Variabel Penelitian

Pada penelitian ini, digunakan dua macam variabel penelitian, yaitu :

#### 1. Variabel Bebas

- a. Ekstrak cabe jawa
- b. Zinc (Zn)

#### 2. Variabel Terikat

Jumlah sel germinal testis tikus putih jantan dewasa

### D. Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3.** Definisi Operasional Penelitian

Variabel	Definisi	Hasil Ukur	Skala Ukur
Ekstrak cabe jawa <i>(Piper retrofractum Vahl)</i>	Buah cabe jawa ( <i>Piper retrofractum Vahl</i> ) dikeringkan lalu digiling sampai halus dan dilakukan proses maserasi dengan konsentrasi 50 mg/ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok II dan III : 500 mg/kgBB/hari</li> <li>• Kelompok IV: 750 mg/kgBB/hari</li> </ul>	Numerik
Zinc sulfat (ZnSO <sub>4</sub> )	Suplemen mikro mineral yang dilarutkan sehingga berbentuk cairan yang diberikan secara oral berupa ZnSO <sub>4</sub>	Kelompok III dan IV diberikan dosis 1 mg/kgBB/hari	Numerik
Gambaran Mikroskopik Testis	Gambaran mikroskopik testis yang diamati adalah jumlah sel-sel germinal. Sel-sel ini terdapat pada tubulus seminiferus dan akan mengalami pembelahan yang kompleks untuk membentuk spermatozoa. Terdiri dari spermatogonium, spermatosit primer, spermatid.	Sediaan mikroskopik dengan pewarnaan HE dengan pembesaran mikroskop 40x10 (Wahyuni, 2012). Pengamatan dilakukan pada 9 (Sembilan) tubulus seminiferus tiap pelakuan (Astuti, 2008)	Numerik

## **E. Alat dan Bahan**

Pada penelitian ini digunakan alat-alat dan bahan-bahan penelitian, yaitu:

### **1. Alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan yaitu : kandang tikus yang terbuat dari bak plastik yang ditutupi dengan kawat pada bagian atasnya sebanyak 6 kandang, botol yang tutupnya diberi pipa alumunium sebagai tempat minum tikus, spuit oral, toples plastik yang mempunyai tutup, kapas, jarum pentol, gabus/busa, seperangkat alat bedah (*dissecting set*), Improved Neubauer, objek glass dan mikroskop.

### **2. Bahan Penelitian**

Bahan Biologis : tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dewasa, usia 2-4 bulan dan dalam keadaan sehat dengan berat 200 gram. Bahan kimia adalah ekstrak cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl) dengan dosis pada Kelompok Perlakuan I dan II sebesar 500 mg/kgBB/hari dan dosis pada kelompok III sebesar 750 mg/kgBB/hari , ZnSO<sub>4</sub> dengan dosis 1 mg/kgBB/hari, alkohol 70%-100%, formalin buffer, aquadest, eter dan pelet lele (pelet ikan) sebagai pakan tikus.

## **F. Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi dari penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dewasa dan sehat yang ditandai dengan gerak aktif, diperoleh dari IPB (Institut Pertanian Bogor). Besar sampel ditentukan berdasarkan buku panduan penelitian WHO yaitu minimal 5 ekor tikus putih jantan tiap

kelompok. Sedangkan, banyaknya pengulangan ditentukan berdasarkan rumus Ferderrer :

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

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

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

t = kelompok perlakuan (4 kelompok)

n = jumlah pengulangan atau sampel tiap kelompok

#### **G. Kriteria Inklusi dan Ekslusi**

Pada penelitian ini digunakan tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang memiliki kriteria sebagai berikut :

##### **1. Kriteria Inklusi**

- a. Sehat
- b. Memiliki berat badan antara 200-250 gram
- c. Jenis kelamin jantan
- d. Usia 2-4 bulan

##### **2. Kriteria Ekslusi**

- 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).

## H. Prosedur Penelitian

Untuk prosedur pada penelitian ini, diadakan berbagai langkah-langkah yang sesuai, sebagai berikut :

### 1. Pemeliharaan Hewan Uji

Pada penelitian kali ini hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Sprague dawley dewasa usia 2-4 bulan dengan berat  $\pm$  200 gram dan sehat. Hewan uji di tempatkan pada kandang yang terbuat dari baskom/wadah plastik yang alasnya dilapisi dengan sekam padi dan diganti setiap 2 hari sekali untuk menjaga kandang tetap bersih dan mencegah timbulnya penyakit akibat infeksi akibat perkembangan mikroorganisme yang dapat mengganggu kelangsungan hidup hewan uji. Kandang diletakkan dalam suhu kamar dan menggunakan sinar matahari secara tidak langsung. Suhu dan kelembaban ruangan dibiarkan berada dalam kisaran alamiah. Pada bagian atas kandang (baskom) ditutupi dengan kawat dan diletakkan botol tempat minum untuk hewan uji. Untuk makanan hewan uji diberikan berupa pelet/pakan ikan. Makanan dan minuman di tempatkan pada wadah terpisah dan diganti setiap 2 hari sekali (pagi dan sore hari).

### 2. Persiapan Hewan Uji

Sebelum diberi perlakuan, hewan uji diadaptasikan selama satu minggu di *Animal house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Setiap hewan uji diperhatikan kesehatan fisiknya (gerakan yang aktif, tidak

terdapat kerusakan pada tubuh hewan uji), kebersihan kandang dan frekuensi pemberian makan.

### 3. Penyediaan Ekstrak Cabe Jawa

Pada penelitian ini digunakan bahan ekstrak dari cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl), ada langkah-langkah pembuatan bahan ekstrak tersebut, yaitu :

Cara pembuatan ekstrak cabe jawa :

Ekstrak dibuat di Bagian Kimia Organik FMIPA Unila. Proses pembuatan ekstrak etanol cabe jawa dalam penelitian ini menggunakan etanol teknis 97% sebagai pelarut.

Ekstraksi dimulai dari penimbangan cabe jawa. Selanjutnya seluruh bagian dikeringkan dalam almari pengering, dibuat serbuk dengan menggunakan blender atau mesin penyerbuk. Etanol teknis dengan kadar 97 % ditambahkan untuk melakukan ekstraksi dari serbuk ini selama kurang lebih 2 (dua) jam kemudian dilanjutkan maserasi selama 24 jam. Setelah masuk ke tahap filtrasi, akan diperoleh filtrat dan residu. Filtrat yang didapat akan diteruskan ke tahap evaporasi dengan *Rotatory Evaporator* pada suhu 40 ° C sehingga akhirnya diperoleh ekstrak kering. Konsentrasi yang dibutuhkan setelah disaring adalah 50 mg/ml. Lalu kemudian dilarutkan dalam 1 ml air untuk mendapatkan larutan yang homogeny.

Cara perhitungan dosis ekstrak cabe jawa:

Dosis ekstrak cabe jawa yang akan digunakan dalam penelitian ini 500 mg/KgBB dan 750 mg/kgBB hewan uji (Evacuasiy dan Puradisastra, 2010).

a. Dosis untuk tiap tikus kelompok P1

$$500 \text{ mg/KgBB} \times 0,2 \text{ kg(berat tikus)} = 100 \text{ mg}$$

b. Dosis untuk tiap tikus kelompok P2

$$500 \text{ mg/KgBB} \times 0,2 \text{ kg(berat tikus)} = 100 \text{ mg}$$

c. Dosis untuk tiap tikus kelompok P3

$$750 \text{ mg/KgBB} \times 0,2 \text{ Kg(berat tikus)} = 150 \text{ mg}$$

Penentuan dosis untuk masing-masing perlakuan ditetapkan atas rata-rata berat badan hewan uji yaitu sekitar 200 gram. Untuk masing-masing dosis perhari pada tikus dihitung dari konsentrasi larutan stok.

Dosis pemberian ekstrak cabe jawa pada masing-masing tikus kelompok P1, P2 dan kelompok P3 (Lansida, 2003) :

### **Tikus kelompok P1**

Dosis larutan stok = dosis perhari tikus

$$\frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{100 \text{ mg}}{x \text{ ml}} \quad x = 1 \text{ ml}$$

Jadi masing-masing tikus pada kelompok II akan diberikan ekstrak cabe jawa sebanyak 1 ml. Dosis tersebut diberikan 1 kali/hari selama 10 hari perlakuan.

### Tikus kelompok P2

Dosis larutan stok = dosis perhari tikus

$$\frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{100 \text{ mg}}{x \text{ ml}} \quad x = 1 \text{ ml}$$

Jadi masing-masing tikus pada kelompok II akan diberikan ekstrak cabe jawa sebanyak 1 ml. Dosis tersebut diberikan 1 kali/hari selama 10 hari perlakuan.

### Tikus kelompok P3

Dosis larutan stok = dosis perhari tikus

$$\frac{150 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{150 \text{ mg}}{x \text{ ml}} \quad x = 1 \text{ ml}$$

Jadi masing-masing tikus pada kelompok III akan diberikan ekstrak cabe jawa sebanyak 1 ml. Dosis tersebut diberikan 1 kali/hari selama 10 hari perlakuan. Total kebutuhan ekstrak cabe jawa selama 10 hari perlakuan untuk 6 ekor tikus adalah 60 ml.

## 4. Penyediaan Zinc (Zn)

Penentuan dosis zinc didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Fadda *et al* tahun 2008 yaitu pemberian seng yang digunakan adalah *zinc sulphate* ( $\text{ZnSO}_4$ ) sebesar 1 mg/kgBB/hari secara oral. Pemberian ( $\text{ZnSO}_4$ ) untuk masing-masing perlakuan ditetapkan atas rata-rata berat hewan uji yaitu sekitar 200 gr. Dengan demikian dosis yang dibutuhkan untuk setiap ekor tikus dalam penelitian ini adalah:

$$1 \text{ mg/KgBB} \times 0,2 \text{ kg(berat tikus)} = 0,2 \text{ mg.}$$



Total kebutuhan  $ZnSO_4$  selama 10 hari perlakuan untuk 6 ekor tikus adalah 12 mg

## 5. Penentuan dosis campuran ekstrak cabe jawa dan $ZnSO_4$

- a. Pengenceran  $ZnSO_4$  dalam aquadest (Jayanti & Setyaningsih, 2008)

$$\frac{1000 \text{ mg } ZnSO_4}{1000 \text{ ml aquadest}} = \frac{12 \text{ mg } ZnSO_4}{\alpha \text{ ml}}$$

$$\alpha = 12 \text{ ml}$$

- b. Ekstrak cabe jawa +  $ZnSO_4$  yang telah di encerkan

Jumlah total larutan dari campuran ekstrak cabe jawa dan  $ZnSO_4$  selama 10 hari perlakuan untuk 6 ekor tikus adalah :

$$60 \text{ ml ekstrak cabe jawa} + 12 \text{ ml } ZnSO_4 = 72 \text{ ml}$$

Jadi dosis campuran larutan ekstrak cabe jawa dan  $ZnSO_4$  untuk setiap ekor tikus pada kelompok perlakuan P3 dan P4 adalah

sebanyak: : 
$$\frac{72 \text{ ml}}{60 \text{ ekor tikus}} = 1,2 \text{ ml.}$$

## 6. Pemberian Perlakuan

Setiap kelompok mempunyai perlakuan yang berbeda, yaitu :

- Kelompok K : hanya diberi aquades 1,2 ml
- Kelompok P1 : diberi ekstrak cabe jawa 500 mg/kgBB yang dilarutkan dalam 1,2 ml aquadest secara oral setiap hari selama 10 hari
- Kelompok P2 : diberi ekstrak cabe jawa 500 mg/kgBB/hari yang ditambah  $ZnSO_4$  1 mg/kgBB/hari secara oral 1,2 ml setiap hari selama 10 hari

- d. Kelompok P3 : diberi ekstrak cabe jawa 750 mg/kgBB/hari ditambah ZnSO<sub>4</sub> 1 mg/kgBB/hari secara oral 1,2 ml setiap hari selama 10 hari

## 7. Pengamatan

Setelah 10 hari perlakuan, masing-masing hewan coba dikorbankan dengan cara pemberian larutan ether dan selanjutnya dibedah menggunakan alat bedah minor. Selanjutnya dilakukan pengamatan sebagai berikut :

- a. Pengambilan dan pemotongan Testis

Setelah pembedahan selesai, pengambilan bagian testis dengan menggunakan pinset. Kemudian meletakkan testis tikus pada aluminium foil agar mudah memisahkan testis dengan lemak. Lalu dipotong bagian tengah secara horizontal lalu diletakkan di dalam botol berisi formalin.

- b. Pembuatan Preparat Histologi

Pembuatan preparat histologi testis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

Tahap-tahap pembuatan preparat testis sebagai berikut:

### 1) *Fiksasi*

Spesimen berupa potongan testis yang telah dipilih difiksasi dengan larutan pengawet berupa buffer formalin atau formalin 10%. Perbandingan antara volume specimen dengan larutan 1:10 untuk mendapatkan hasil yang baik. Tujuan fiksasi adalah

untuk menghindari terjadinya kerusakan jaringan dan membuat unsur-unsur jaringan stabil dan tahan terhadap perlakuan berikutnya.

## 2) *Trimming*

Organ yang telah difiksasi kemudian dicuci dengan air mengalir lalu dipotong setebal 2-4mm, selanjutnya memasukkan potongan tersebut ke dalam *embedding cassette* dan dicuci kembali dengan air mengalir.

## 3) *Dehidrasi*

Proses dehidrasi dilakukan secara bertahap dengan menggunakan alkohol 70% selama 10 menit, alkohol 80%, 90% dan 96% masing-masing selama 60 menit, kemudian alkohol absolute selama 30 menit. Setelah dehidrasi selesai, dilanjutkan dengan proses *clearing* atau penjernihan menggunakan xylol atau toluol murni. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan kandungan air di dalam jaringan.

## 4) *Infiltrasi Parafin*

Proses infiltrasi dilakukan di dalam oven dengan suhu 56°C. Disebut juga dengan proses impregnasi. Organ testis dimasukkan ke dalam campuran toluol-parafin dengan perbandingan 1:1 selama 30 menit. Kemudian berturut-turut dimasukkan ke dalam : Parafin murni I, II dan III yang masing-masing selama 60 menit.

### 5) *Embedding*

Setelah melalui proses dehidrasi, jaringan yang berada di *embedding cassette* dipindahkan ke dalam *base mold*, kemudian di isi dengan paraffin cair untuk kemudian diletakkan pada balok kayu ukuran 3x3 cm. Jaringan yang sudah diletakkan pada balok kayu disebut blok.

### 6) *Cutting*

Pemotongan atau *cutting* dilakukan pada ruang dingin. Sebelum dipotong, blok terlebih dahulu didinginkan. Pemotongan dilakukan hingga ketebalan 6 mikron. Setelah dipotong, pilih lembaran jaringan yang paling baik, apungkan pada air di dalam *water bath* selama beberapa detik, tunggu sampai potongan mengembang sempurna dan tidak ada kerutan, kemudian letakkan ditengah *slide*. *Slide* kemudian dimasukkan dalam inkubator (suhu 37°C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

### 7) *Staining*

Setelah jaringan melekat sempurna, selanjutnya dilakukan pewarnaan menggunakan zat warna HE dengan cara memasukkan *slide* secara bertahap ke dalam xylol, alkohol, aquades, hematoksilin, acid alkohol dan eosin.

### 8) *Mounting*

Setelah pewarnaan selesai, *slide* ditempatkan di atas kertas tissue pada tempat datar, kemudian ditetesi dengan kanada balsam dan ditutup dengan *cover glass*.

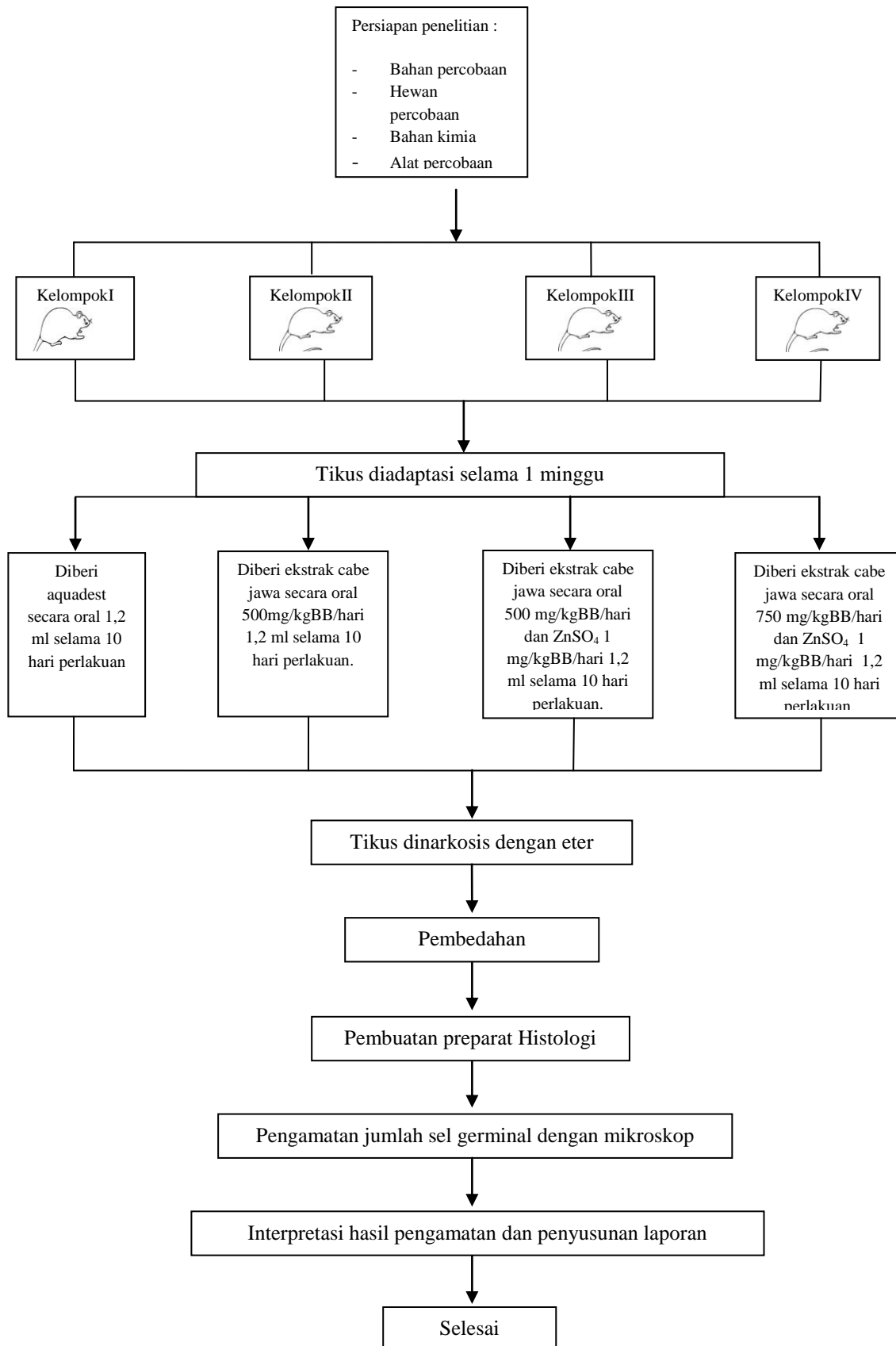
#### c. Perhitungan Populasi Sel germinal

Setelah preparat selesai, dilakukan perhitungan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Perhitungan populasi sel germinal testis pada 9 (Sembilan) tubulus seminiferus tiap pelakuan (Astuti, 2008) di bawah mikroskop dengan pembesaran 40x10. Perhitungan populasi sel germinal terdiri dari :

- 1) Jumlah sel spermatogonium
- 2) Jumlah sel spermatosit primer
- 3) Jumlah sel spermatid

## I. Analisis Data dan Pengujian Hipotesis

Kelompok penelitian ini terdiri dari 4 kelompok, yaitu : 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan dalam 6 kali pengulangan. Pada tiap kelompok, data yang terkumpul dianalisis menggunakan program statistic dengan menggunakan uji *one way anova* untuk menguji perbedaan rerata kelompok perlakuan. Jika hasil bermakna ( $p < 0,05$ ) maka dilanjutkan dengan uji *Post Hock*. Jika sebaran data yang didapat melalui uji normalitas *shapiro wilk* berdistribusi tidak normal ( $p > 0,05$ ) maka analisa data dapat menggunakan uji *kruskal wallis*. Jika hasil bermakna ( $p < 0,05$ ) maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* (Dahlan, 2004).



**Gambar 6.** Alur Penelitian