

III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode *posttest only with control group design*.

B. Tempat dan Waktu

Perlakuan pada hewan percobaan dilakukan di *Animal House*, Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, sedangkan pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Periode penelitian selama 3 bulan yaitu bulan Oktober 2012 hingga Desember 2012.

C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley berumur 10-16 minggu yang diperoleh dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor.

Sampel penelitian sebanyak 30 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok, dengan rumus penentuan sampel berdasarkan rumus Frederer sebagai berikut (Sastroatmojo dan Ismael, 2008).

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

$$(5 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Keterangan:

t = jumlah perlakuan.

n = jumlah hewan coba tiap kelompok perlakuan.

Jadi, tiap kelompok perlakuan dibutuhkan minimal sampel ($n \geq 5$) untuk masing-masing perlakuan dan jumlah perlakuan sebanyak 5 buah, sehingga sampel perlakuan minimal yang dibutuhkan adalah sebanyak 25 ekor.

Kriteria inklusi

1. Sehat
2. Memiliki berat badan antara 200-250 gram
3. Jenis kelamin jantan
4. Berusia sekitar \pm 10-16 minggu (dewasa)

Kriteria eksklusi

1. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok, atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, genital)
2. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10 % setelah masa adaptasi di laboratorium.

D. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang akan digunakan ada dua, yaitu gentamisin dengan dosis 80mg/kgBB dan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa* L.) dengan dosis 500mg/kgBB, 1000mg/kgBB, dan 1500mg/kgBB.

2. Bahan Kimia

Bahan yang akan digunakan untuk pembuatan preparat histologis dengan metode parafin meliputi: bahan utama berupa potongan jaringan hewan yang telah difiksasi dengan Buffer Neutral Formalin (BNF) 10%. Larutan yang diperlukan adalah, ethanol absolut, xylol, parafin, gliserin 99,5 %, ewit (albumin), larutan hematoksilin, lithium karbonat, larutan eosin dan DPX (Muntiha, 2001).

3. Alat Penelitian

a. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- 1) Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g, untuk menimbang berat tikus.
- 2) Sduit oral 1 cc
- 3) Spet oral
- 4) Gunting minor set, untuk membedah perut tikus (laparotomi).
- 5) Kipas dan alkohol.

b. Alat pembuatan preparat histopatologi

Adapun alat pembuat preparat histologi adalah talenan, pisau skalpel, pinset, saringan, *tissue casset*, mesin prosessor otomatis, mesin vakum, mesin bloking, *freezer* (-20°C), mesin mikrotom, pisau mikrotom, *water bath* 46 °C, kaca obyek, kaca penutup, rak khusus untuk pewarnaan, oven 60°C (Muntiha, 2001).

E. Prosedur Penelitian

1. Prosedur Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.)

a. Cara pembuatan ekstrak etanol jintan hitam:

Ekstrak dibuat di Labotatorium Kimia Organik Fakultas MIPA Unila.

Proses pembuatan ekstrak etanol jintan hitam dalam penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut.

Menurut Sulistianto dkk (2004), ekstraksi dimulai dari penimbangan jintan hitam. Selanjutnya seluruh bagian dikeringkan dalam almari pengering, dibuat serbuk dengan menggunakan *blender* atau mesin penyerbuk. Etanol dengan kadar 70 % 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. Selanjutnya dari ekstrak ini akan dibuat larutan stok. Larutan stok yang dimaksud adalah larutan pekat dengan dosis 100g/100ml, hal ini dimaksud agar mempermudah dalam perlakuan pada tikus saat percobaan. Ekstrak dibuat dengan melarutkan 100 g berat ekstrak jintan hitam ke dalam 100 ml akuades sehingga 1 ml ekstrak mengandung 1000 mg.

b. Cara perhitungan dosis ekstrak jintan hitam:

Dosis pertengahan ekstrak etanol jintan hitam yang akan digunakan dalam penelitian ini, berdasarkan pada penelitian Tamad dkk (2011) sebesar 500, 1000 dan 1500mg/kgBB. Pada penelitian tersebut dosis ini telah terbukti dapat menurunkan kadar serum kreatinin, serum urea, dan *Blood Urea Nitrogen* (BUN) terhadap tikus yang diinduksi gentamisin.

1) Dosis untuk tiap tikus kelompok III

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

2) Dosis untuk tiap tikus kelompok IV

$$1000\text{mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 200 \text{ mg}$$

3) Dosis untuk tiap tikus kelompok V

$$1500\text{mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 300 \text{ mg}$$

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

Dosis pemberian ekstrak jintan hitam pada masing-masing tikus kelompok III, IV dan V.

Tikus kelompok III

Dosis larutan stok = dosis per hari tikus

$$\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{100 \text{ mg}}{x \text{ ml}}$$

$$x = 0,1$$

Jadi, masing-masing tikus pada kelompok III akan diberikan ekstrak jintan hitam sebanyak 0,1 ml.

Tikus kelompok IV

Dosis larutan stok = dosis per hari tikus

$$\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{200 \text{ mg}}{x \text{ ml}}$$

$$x = 0,2$$

Jadi, masing-masing tikus pada kelompok IV akan diberikan ekstrak jintan hitam sebanyak 0,2 ml.

Tikus kelompok V

Dosis larutan stok = dosis per hari tikus

$$\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{300 \text{ mg}}{x \text{ ml}}$$

$$x = 0,3$$

Jadi, masing-masing tikus pada kelompok V akan diberikan ekstrak jintan hitam sebanyak 0,3 ml.

2. Prosedur Pemberian Dosis Gentamisin

Dosis gentamisin yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan dari hasil penelitian sebelumnya yang telah terbukti dapat meningkatkan serum kreatinin, serum urea dan BUN pada tikus percobaan yang diberikan gentamisin 80mg/kgBB/hari dan diberikan selama 8 hari (Singh dkk, 2009).

Dosis gentamisin pada tikus yang telah terbukti toksis yaitu 80mg/KgBB.

Hal ini berarti sebagai berikut :

Pada berat tikus rata-rata sekitar 200 mg atau 0,2 kg maka dosis per ekor tikus sebesar $80\text{mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 16 \text{ mg}$ (per ekor tikus).

Dosis gentamisin yang dipilih adalah vial 80 mg dalam 2 ml, hal ini dikarenakan pemberian lewat intraperitoneal. Maka perhitungan dosis injeksinya adalah sebagai berikut :

$$\frac{80 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{16 \text{ mg}}{x \text{ ml}}$$

Maka x adalah

$$x = \frac{16 \text{ mg} \times 2 \text{ ml}}{80 \text{ mg}}$$

$$x = 0,4 \text{ ml}$$

3. Prosedur Penelitian

- a. Tikus sebanyak 30 ekor, dikelompokkan dalam 5 kelompok.
Kelompok I sebagai kontrol normal, dimana hanya akan diberi akuades. Kelompok II sebagai kontrol patologis, dimana diberikan gentamisin dengan dosis 80mg/kgBB. Kelompok III adalah perlakuan coba dengan pemberian ekstrak jintan hitam dosis 500mg/kgBB, kelompok IV dengan dosis ekstrak jintan hitam sebanyak 1000mg/kgBB, dan kelompok V dengan dosis ekstrak jintan hitam sebanyak 1500mg/kgBB. Kemudian selang 2 jam kelompok III, IV dan V diberikan induksi gentamisin sebesar 80mg/kgBB. Masing-masing diberikan secara intraperitoneal selama 8 hari. Kemudian pada hari ke-9 dan ke-10, masing-masing tikus dari kelompok III, IV dan V tetap diberikan ekstrak jintan hitam.
- b. Mencekoki tikus dengan ekstrak jintan hitam selama 8 hari dan melakukan injeksi gentamisin secara intraperitoneal selama 8 hari, dilanjutkan pemberian ekstrak jintan hitam per oral hingga hari ke-10. Tikus tetap diberikan makan *ad libitum*.
- c. Setelah 10 hari, perlakuan diberhentikan.
- d. Enam tikus jantan dari tiap kelompok dinarkosis dengan kloroform.

- e. Dilakukan laparotomi, diambil testis untuk dibuat sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode parafin dan pewarnaan Hematoksilin Eosin. Hematoksilin mempunyai sifat pewarna basa, yaitu memulas unsur jaringan yang basofilik. Eosin memulas unsur jaringan yang bersifat asidofilik. Kombinasi ini paling banyak digunakan (Junqueira dkk, 2005). Sampel testis ini difiksasi dengan merendam jaringan dengan larutan Buffered Neutral Formalin (BNF) 10% berfungsi sebagai bahan pengawet agar terhindar dari pencernaan jaringan oleh enzim-enzim (otolisis) atau bakteri dan untuk melindungi struktur fisik sel. Selanjutnya sampel ini dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Unila untuk pembuatan sediaan mikroskopis sel germinal testis.
- f. Metode teknik histopatologi adalah menurut Akoso dkk (1999) :
- 1) *Fixation*
 - a) Memfiksasi spesimen berupa potongan organ testis yang telah terpilih segera dengan larutan pengawet formalin 10 %.
 - b) Mencuci dengan air mengalir.
 - 2) *Trimming*
 - a) Mengecilkan organ $\pm 3 \text{ mm}$.
 - b) Memasukkan potongan organ testis tersebut ke dalam *embedding cassette*.

3) *Dehidrasi*

- a) Menuntaskan air dengan meletakkan *embedding cassette* pada kertas tisu.
- b) Berturut-turut melakukan perendaman organ testis dalam alkohol bertingkat 80% dan 95% masing-masing selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan perendaman alkohol 95%, absolut I, II, III selama 1 jam.

4) *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan xilol I, II, III masing-masing 1 jam.

5) *Impregnasi*

Impregnasi dengan menggunakan parafin I, II, III masing-masing selama 2 jam.

6) *Embedding*

- a) Membersihkan sisa parafin yang ada pada pan dengan memanaskan beberapa saat di atas api dan usap dengan kapas.
- b) Menyiapkan paraffin cair dengan memasukkan paraffin ke dalam cangkir logam dan memasukkan dalam oven dengan suhu di atas 58°C.
- c) Menuangkan paraffin cair dalam pan.

- d) Memindahkan satu per satu dari *embedding cassette* ke dasar pan dengan mengatur jarak satu dengan yang lainnya.
- e) Memasukkan pan dalam air.
- f) Melepaskan paraffin yang berisi potongan testis dari pan dengan memasukkan ke dalam suhu 4-6°C beberapa saat.
- g) Memotong paraffin sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan scapel/pisau hangat.
- h) Meletakkan pada balok kayu, ratakan pinggirnya dan buat ujungnya sedikit meruncing.
- i) Memblok paraffin siap potong dengan mikrotom.

7) *Cutting*

- a) Melakukan pemotongan pada ruangan dingin.
- b) Sebelum memotong, mendinginkan blok terlebih dahulu.
- c) Melakukan pemotongan kasar, dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron.
- d) Memilih lembaran potongan yang paling baik, mengapungkan pada air dan menghilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
- e) Memindahkan lembaran jaringan ke dalam *water bath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
- f) Dengan gerakan menyendok mengambil lembaran jaringan tersebut dengan *slide* bersih dan menempatkan di tengah atau

pada sepertiga atas atau bawah, mencegah jangan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan.

g) Menempatkan *slide* yang berisi jaringan pada inkubator (pada suhu 37°C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

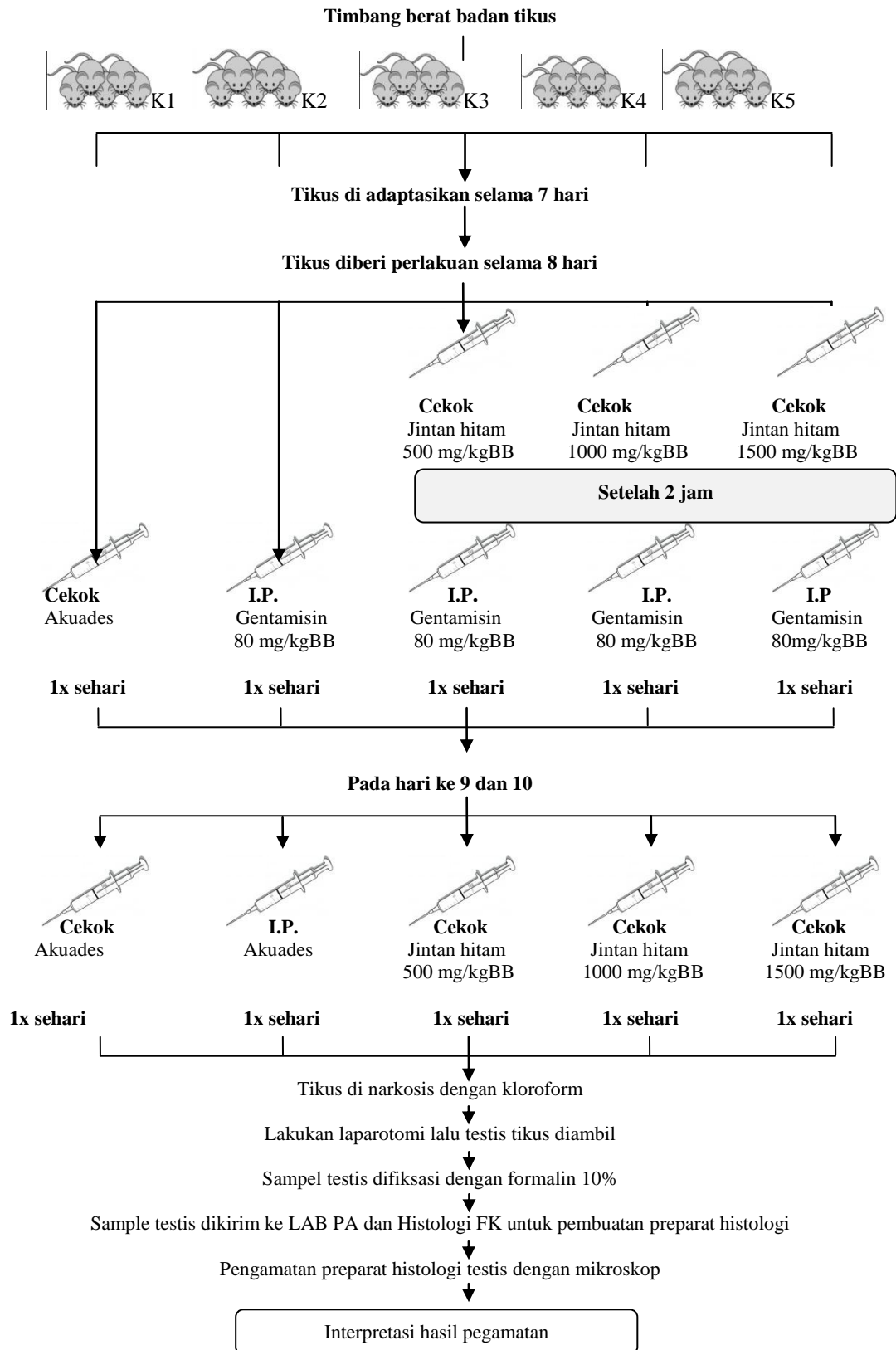
8) *Staining* (pewarnaan) dengan Harris Hematoxylin Eosin

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide* yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut. Untuk pewarnaan, zat kimia yang pertama digunakan xilol I, II, III masing-masing selama 5 menit. Kedua, zat kimia yang digunakan Alkohol absolut I, II, III masing-masing selama 5 menit. Zat kimia yang ketiga, akuades selama 1 menit. Keempat, potongan organ dimasukkan dalam zat warna Harris Hematoxylin selama 20 menit. Kemudian memasukkan potongan organ testis dalam akuades selama 1 menit dengan sedikit menggoyang-goyang organ. Keenam, mencelupkan organ dalam asam alkohol 2-3 celupan. Ketujuh, dibersihkan dalam akuades bertingkat masing-masing 1 menit dan 15 menit. Kedelapan, memasukkan potongan organ dalam Eosin selama 2 menit. Kesembilan, secara berurutan memasukkan potongan organ dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 96%, alkohol absolut III dan IV masing-masing selama 3 menit. Terakhir, memasukkan dalam xilol IV dan V masing-masing 5 menit.

9) *Mounting*

Setelah pewarnaan selesai, menempatkan *slide* di atas tisu pada tempat datar, meneteskan dengan bahan *mounting* yaitu kanada balsam dan tutup dengan *cover glass*, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

10) Membaca *slide* dengan mikroskop



Gambar 6. Diagram alir penelitian

F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

- a. Variabel independen adalah pemberian ekstrak jintan hitam.
- b. Variabel dependen adalah jumlah sel spermatogenik.

2. Definisi Operasional Variabel

- a. Pemberian ekstrak jintan hitam

Pemberian ekstrak jintan hitam dilakukan pada tikus percobaan. Tikus percobaan yang dilakukan terbagi atas 5 kelompok percobaan.

- 1) Kelompok I

Tikus diberikan akuades sebanyak 0,4 ml.

- 2) Kelompok II

Tikus diberikan gentamisin secara intraperitoneal sebanyak 0,4 ml selama 8 hari, kemudian dilanjutkan dengan pemberian 0,4 ml akuades pada hari ke-9 dan ke-10.

- 3) Kelompok III

Tikus diberikan ekstrak jintan hitam sebanyak 0,1 ml per oral kemudian 2 jam kemudian diberikan gentamisin secara

intraperitoneal sebanyak 0,4 ml. Kedua perlakuan ini diberikan selama 8 hari. Pada hari ke-9 dan ke-10, tikus diberikan ekstrak jintan hitam per oral sebanyak 0,1 ml.

4) Kelompok IV

Tikus diberikan ekstrak jintan hitam sebanyak 0,2 ml per oral kemudian 2 jam setelahnya diberikan gentamisin 0,4 ml secara intraperitoneal. Kedua perlakuan ini diberikan selama 8 hari. Pada hari ke-9 dan ke-10, tikus diberikan ekstrak jintan hitam per oral sebanyak 0,2 ml.

5) Kelompok V

Tikus diberikan ekstrak jintan hitam sebanyak 0,3 ml per oral kemudian 2 jam setelahnya diberikan gentamisin 0,4 ml secara intraperitoneal. Kedua perlakuan ini diberikan selama 8 hari. Pada hari ke-9 dan ke-10, tikus diberikan ekstrak jintan hitam sebanyak 0,3 ml per oral.

b. Jumlah sel spermatogenik

Sel spermatogenik terdiri dari spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder dan spermatid (Junqueira dan Carneiro, 2005). Semua sel pada semua tahap perkembangan yang telah disebutkan, akan dihitung secara keseluruhan per tubulus seminiferus sebagai sel

spermatogenik. Menurut Wahyuni (2012), karakteristik sel spermatogenik sebagai berikut.

- 1) Jumlah sel spermatogonium : jumlah sel dengan bentuk bulat, dekat membran basal, inti berbentuk lonjong dengan kromatin halus dan selaput inti tipis yang diamati dan dihitung dibawah mikroskop
- 2) Jumlah sel spermatosit : jumlah sel berbentuk bulat, besar, inti gelap dengan kromosom terlihat jelas yang diamati dan dihitung dibawah mikroskop
- 3) Jumlah sel spermatid : jumlah sel berbentuk bulat, lebih kecil dari spermatosit, inti bulat, pucat dan terang yang diamati dan dihitung dibawah mikroskop

Sediaan mikroskopis dengan pewarnaan HE diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 X 10 (Wahyuni, 2012). Pengamatan akan dilakukan pada sembilan tubulus seminiferus untuk tiap perlakuan (Astuti dkk, 2008).

G. Analisis Data

Analisis data berupa variabel numerik. Pada kelompok yang tidak berpasangan akan diuji dengan menggunakan uji *one way annova* kemudian dilanjutkan dengan *pos hoc test* metode *tukey test* untuk mengetahui

kelompok mana yang berbeda secara bermakna. Untuk uji normalitas data akan dilakukan uji Shapiro-Wilk karena jumlah sampel < 50 . Apabila data tidak memenuhi syarat penelitian, maka akan diuji dengan uji *Kruskal Wallis*.