

BAB III

SUBYEK DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek Penelitian, Kriteria Inklusi dan Kriteria Eksklusi

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan adalah 30 mencit jantan (*Mus musculus L*) yang sehat menurut kriteria inklusi. Subjek dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol buah tomat yang didapat dari Rumah Hewan SITH ITB.

3.1.2 Kriteria inklusi

1. Mencit jantan berusia 8-10 minggu
2. Sehat dengan pergerakan yang aktif
3. Mencit dengan berat 20-35 gram

3.1.3 Kriteria eksklusi

1. Mencit pernah menjadi objek penelitian sebelumnya
2. Berat badan turun lebih dari 10% pada masa adaptasi atau perlakuan
3. Sakit atau mati saat masa adaptasi atau perlakuan

3.1.4 Sampel

Besar sampel pada penelitian ini dihitung dengan menggunakan “Mead equation” atau “resource equation”.^{27,28} Adapun rumus untuk persamaan tersebut adalah

$$E=N-T$$

Keterangan : E= derajat kebebasan yang berada pada rentang 10-20

N= jumlah total hewan coba (N= n x T)

t= jumlah perlakuan

Perhitungan menggunakan persamaan Mead menunjukkan bahwa rentang jumlah sampel yang dapat digunakan pada penelitian ini adalah 3-5 ekor hewan coba/kelompok. Namun, pada penelitian ini digunakan derajat kebebasan 15 (E=15).²⁹ sehingga jumlah sampel yang diperoleh adalah

$$E = N - T$$

$$N = E + T$$

$$= 15 + 5$$

$$= 20$$

$$\text{Maka } n = \frac{N}{T} = \frac{20}{5} = 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut diperoleh jumlah sample per kelompok percobaan adalah 4 ekor. Kemudian dilakukan penambahan jumlah sampel 10% sampel untuk menghindari adanya *drop out* sehingga jumlah sampel per kelompok percobaan menjadi 5 ekor atau total 30 ekor untuk seluruh kelompok.

3.1.5 Prosedur Penelitian

3.1.5.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah tomat sayur lokal. Tomat yang dipilih adalah buah tomat matang berwarna merah. Buah tomat didapatkan dari perkebunan tomat di desa Ciku Kelurahan Cikitu Kecamatan Pacet. Bawang putih sebagai indikator didapatkan dari perkebunan bawang putih di desa Panundaan Kecamatan Ciwidey.

3.1.5.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan selama penelitian adalah sebagai berikut:

1. Kandang Mencit

Kandang mencit berupa bahan plexi glass berukuran 28 x 34 x 14 cm. Kandang mencit beralaskan serbuk kayu untuk menyerap urin dan kotoran hewan coba. Pembersihan kandang dan penggantian sekam dilakukan paling sedikit seminggu 2 kali.

2. Tempat pakan dan minum

Tempat pakan yang digunakan berupa mangkok kecil yang terbuat dari plastik. Tempat minum mencit menggunakan botol kaca yang dilengkapi dengan pipa logam.

3. Sarung tangan

Sarung tangan digunakan untuk melindungi tangan dari gigitan mencit dan menjaga kebersihan penelitian.

4. Label

Label digunakan untuk memberikan tanda pada kandang mencit.

5. Syringe 1 cc/ml

Jarum suntik yang digunakan untuk memberikan ekstrak tomat secara peroral sesuai dosis yaitu 12,5mg/kgBB, 25mg/kgBB, 50mg/kgBB.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian menggunakan eksperimental laboratories secara *in vivo* pada mencit jantan.

3.2.2 Variabel Penelitian

3.2.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas (*independent*) dari penelitian ini yaitu dosis ekstrak etanol buah tomat.

3.2.2.2 Variabel Bebas

Variabel terikat (*dependent*) dari penelitian ini yaitu kualitas sperma pada mencit jantan.

3.2.2.3 Variabel Terkendali

Sesuai dengan galur mencit, jenis kelamin mencit, umur mencit, berat badan mencit, makanan mencit, minuman mencit, pencahayaan kandang, dan ventilasi kandang.

Tabel 3. 1 Definisi Variable Operasional

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Jumlah Sperma	Banyaknya sperma normal >20 juta	Improved Neubauer	Dalam satuan juta/mL	Rasio
2.	Morfologi normal sperma	Bentuk sperma normal terdiri atas kepala dan ekor.	Mikroskop cahaya	Jumlah sperma normal satuan dalam %	Rasio
3	Motilitas sperma	Kemampuan sperma normal bergerak dalam medium cair dengan	Mikroskop cahaya	1. Progressive motility :Baik dalam % (a) 2. Non-progressive: Bergerak	Rasio

	kecepatan 1-4 mm/menit.		ditempat atau berkelok dalam %
	Sperma abnormal seperti bergerak lambat, tidak bergerak pada garis lurus, atau keduanya.		(b)
		3.	Immotility: Tidak bergerak dalam % (c)
4.	Ekstrak etanol tomat yang di larutkan dengan etanol 95%	Serbuk kering yang di peroleh dari hasil ekstraksi buah tomat dengan menggunakan pelarut etanol 95%	Gelas ukur a. Ekstrak tomat dengan Dosis 12,5 mg/kgBB b. Ekstrak tomat dengan Dosis 25mg/kgBB c. Ekstrak tomat dengan Dosis 50mg/kgBB
			Rasio

3.2.3 Prosedur Penelitian

A. Pembuatan Ekstrak Tomat

Pembuatan ekstrak tomat dilakukan di Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran. Simplisia (tomat) yang sudah dipotong tipis-tipis direndam dalam pelarut etanol 95%, kemudian dipanaskan pada suhu tertentu sambil pelarutnya di sirkulasi sekitar 8 jam. Kemudian di ambil ekstrak cairnya dan di pekatkan pada suhu 30°C sampai 40°C . Selanjutnya ekstraksi buah tomat di maserasi selama 3x24 jam sebanyak 10kg buah tomat. Selanjutnya dilakukan evaporasi untuk menghilangkan pelarutnya dengan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak.

B. Penentuan Dosis Ekstrak Tomat

Berdasarkan penelitian sebelumnya (Atmaja, 2014) terhadap mencit menggunakan bahan ekstrak tomat yang diberikan untuk meningkatkan kualitas sperma yaitu dosis 12mg/kgBB, 25mg/kgBB, 50mg/kgBB.

C. Adaptasi Hewan Coba

Hewan yang digunakan adalah hewan yang telah diseleksi dan sesuai kriteria inklusi dan eksklusi. Sejumlah mencit yang sudah ditambahkan 10% atau sekitar 30 mencit akan di bagi menjadi 6 kelompok secara acak, 10 kelompok menjadi infertil dan 20 kelompok untuk diberikan perlakuan. Kandang mencit berupa bahan plexi glass berukuran 28 x 34 x 14 cm beralaskan serbuk kayu untuk menyarap urin dan kotoran hewan coba. Tempat pakan yang digunakan berupa mangkok kecil yang terbuat dari plastik dan tempat minum mencit menggunakan botol kaca yang dilengkapi dengan pipa logam. Mencit akan diberikan waktu adaptasi selama seminggu.

D. Proses Pembuatan Mencit Model Infertil

Pembuatan mencit model infertil dilakukan dengan cara membagi secara acak ada 10 ekor mencit menjadi 2 kelompok, yaitu

- A. Kelompok 1 diberikan 0,5 mL larutan aquades/mencit/hari melalui oral selama 21 hari, setelah 21 hari akan dilakukan pembedahan pada mencit untuk dilihat kualitas spermanya.
- B. Kelompok 2 diberikan infusa bawang putih 0,5 mL untuk membuat mencit menjadi infertil dengan konsentrasi 75mg/ekor/hari melalui oral

selama 21 hari, dengan cara setelah 21 hari akan dilakukan pembedahan untuk dilihat kualitas spermanya.

E. Pemberian Perlakuan Pada Mencit

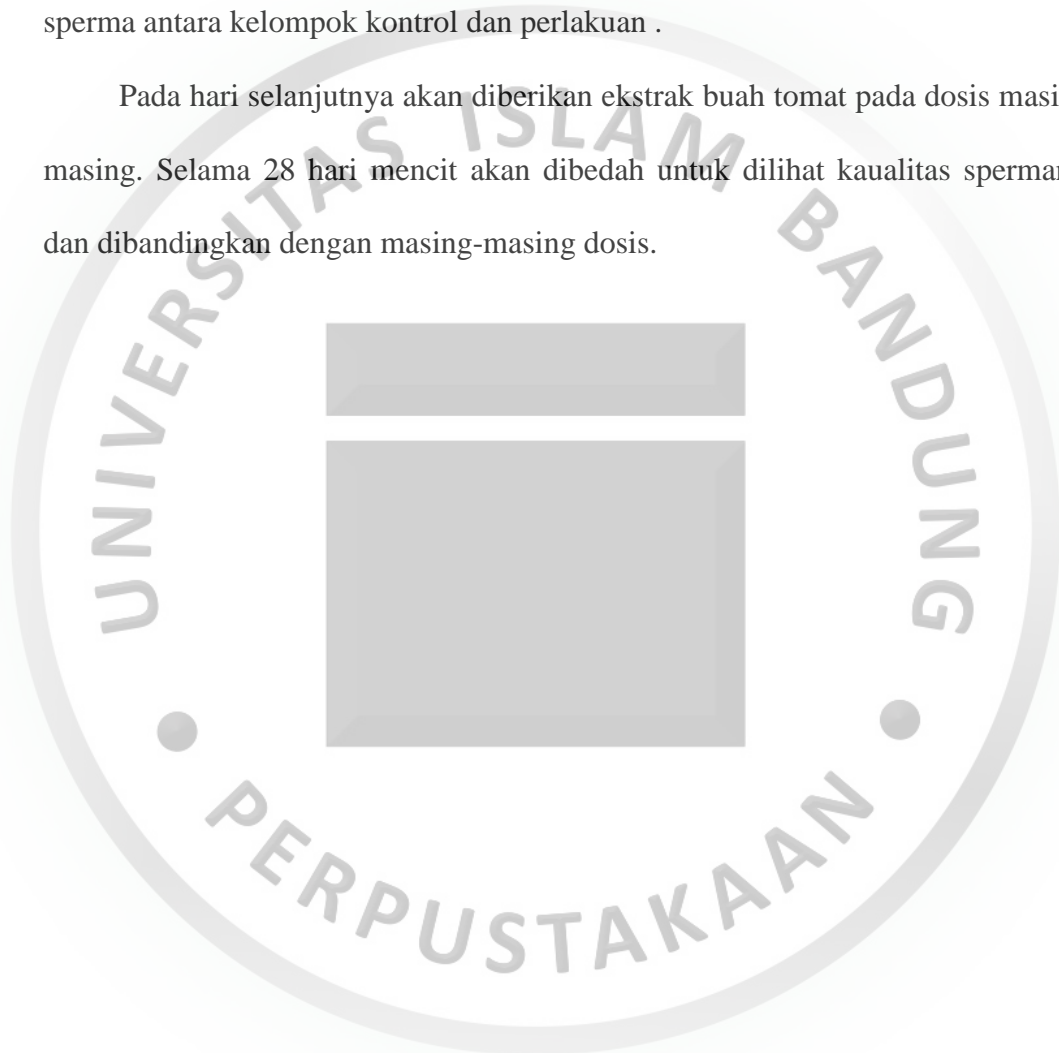
Pemberian perlakuan pada mencit dilakukan dengan cara membagi secara acak 20 ekor mencit yang di bagi menjadi 4 kelompok, yaitu

- A. Kelompok perlakuan 1 diberikan infusa bawang putih dengan konsentrasi 75mg/ekor/hari melalui oral selama 28 hari dan dibiarkan tidak diberi perlakuan.
- B. Kelompok perlakuan 2 diberikan infusa bawang putih dengan konsentrasi 75mg/ekor/hari melalui oral selama 21 hari dan dilanjutkan dengan pemberian ekstrak etanol tomat dengan dosis 12,5mg/kgBB selama 28 hari.
- C. Kelompok perlakuan 3 diberikan infusa bawang putih dengan konsentrasi 75mg/ekor/hari melalui oral selama 21 hari dan dilanjutkan dengan pemberian ekstrak etanol tomat dengan dosis 25mg/kgBB selama 28 hari.
- D. Kelompok perlakuan 4 diberikan infusa bawang putih dengan konsentrasi 75mg/ekor/hari melalui oral selama 21 hari dan dilanjutkan dengan pemberian ekstrak etanol tomat dengan dosis 50mg/kgBB selama 28 hari.

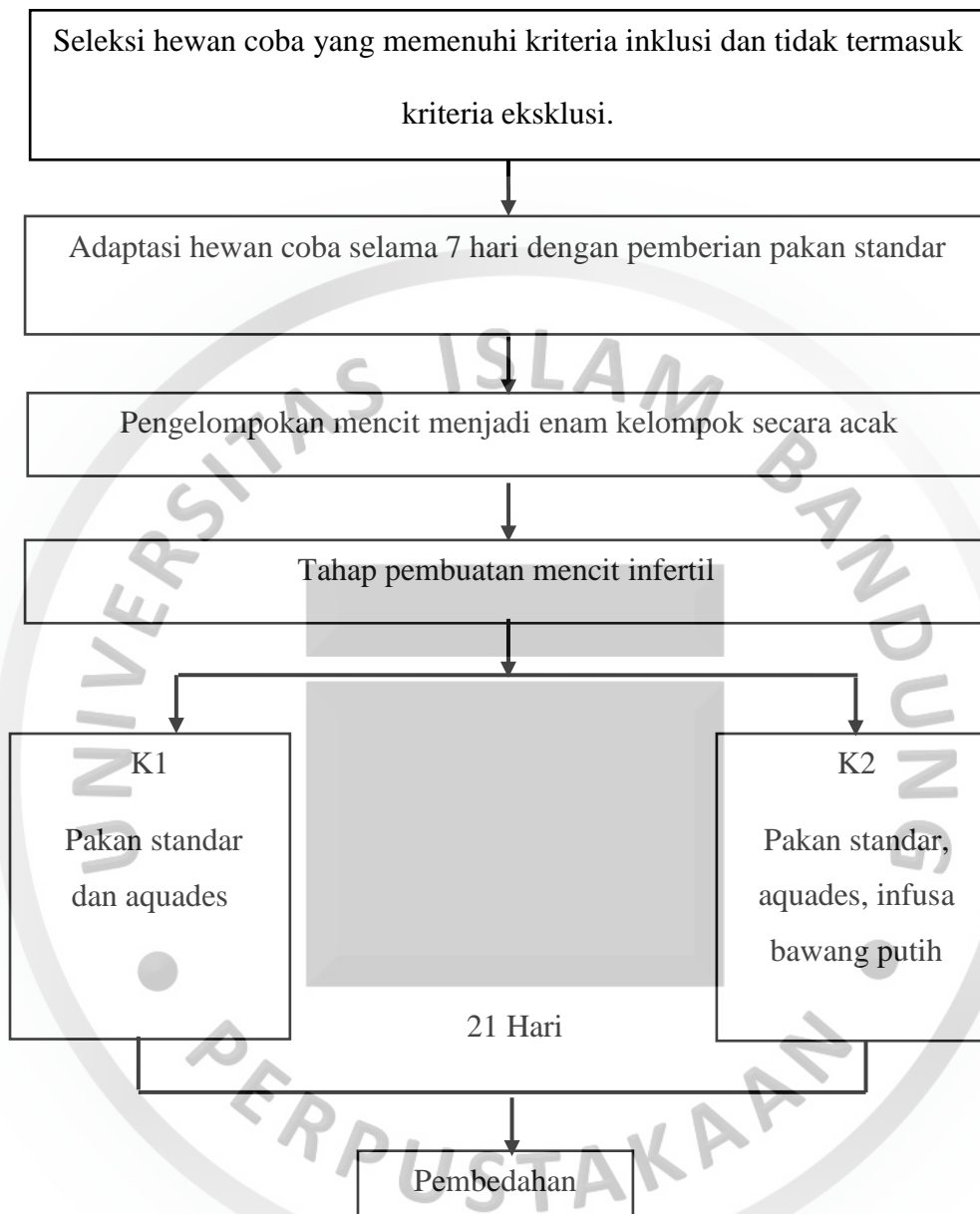
F. Pemeriksaan Kualitas Sperma

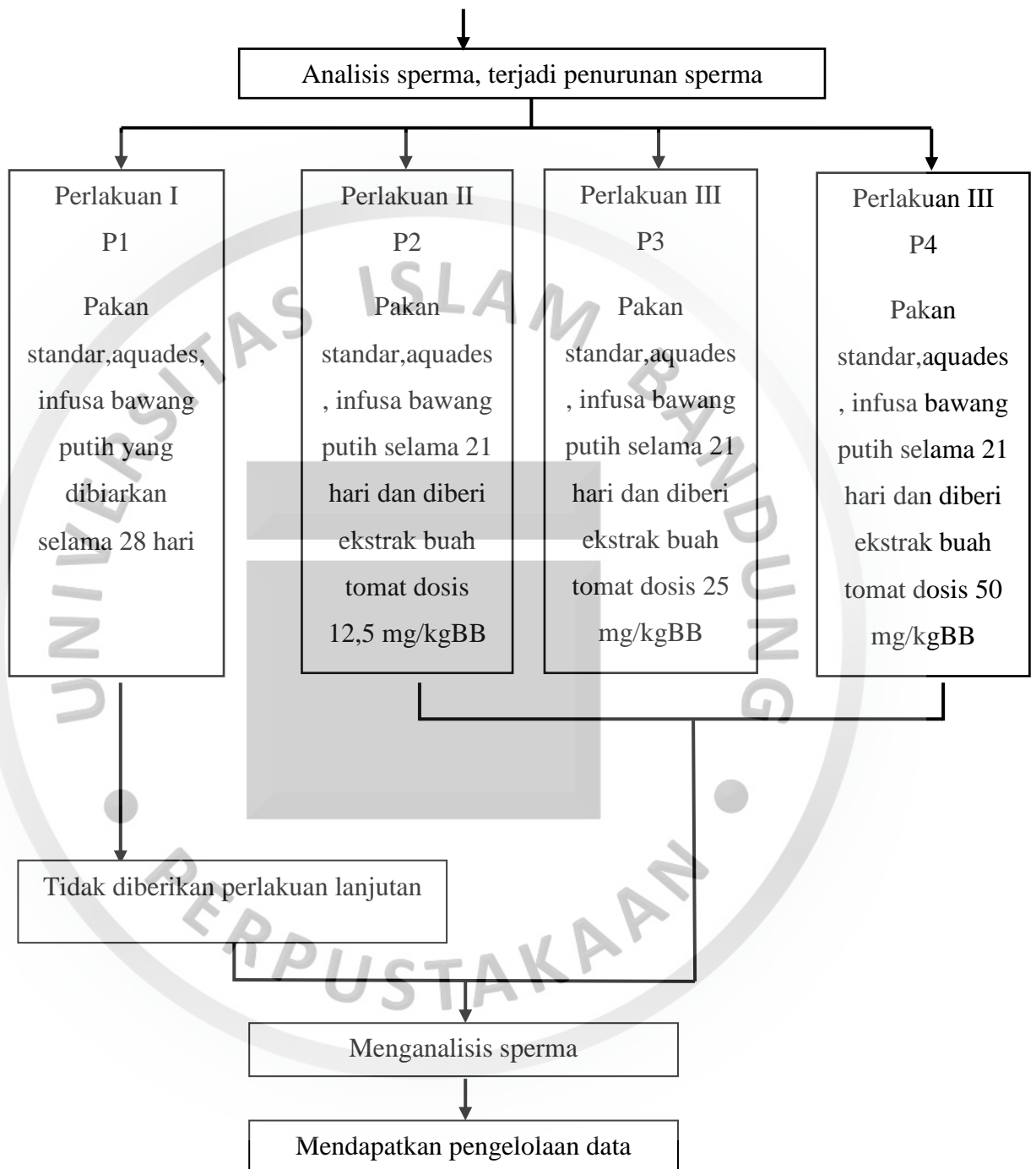
Mencit pada kelompok 1 dan kelompok 2 diambil dan dibedah dahulu untuk melihat kualitas sperma, setelah itu mencit akan dibedah dan diambil testis dan duktus epididimis. Diharapkan akan ada perbedaan terhadap penurunan kualitas sperma antara kelompok kontrol dan perlakuan .

Pada hari selanjutnya akan diberikan ekstrak buah tomat pada dosis masing-masing. Selama 28 hari mencit akan dibedah untuk dilihat kualitas spermanya dan dibandingkan dengan masing-masing dosis.



3.2.4 Alur Penelitian





Gambar 3. 1 Alur Penelitian

3.2.5 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini berupa motilitas, morfologi dan jumlah sperma mencit. Analisis data dilakukan menggunakan *T-Test Independent*, data terlebih dahulu di uji normalitasnya dengan menggunakan *Saphiro Wilk Test* dan uji homogenitas. Data terdistribusi normal dan homogen maka data dapat dianalisis dengan menggunakan *Anova One-Way*. Kemudian di lanjutkan uji *Post Hoc Test*. Selang kepercayaan yang digunakan pada penelitian ini adalah 95% ($\alpha = 0,05$).

3.2.6 Tempat dan Waktu Penelitian

a. Tempat penelitian

Tempat penelitian ini dilakukan di Laboraturium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.

b. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari-Agustus 2019.

3.2.7 Aspek Etik Penelitian

Penelitian ini terdapat dampak aspek etika, yaitu membuat ketidaknyamanan pada hewan uji karena perlakuan dan tindakan yang muncul selama penelitian berlangsung berupa efek toksik pada mencit ketika pemberian zat uji terkait melihat motilitas, morfologi, jumlah kualitas sperma. Untuk mengatasi adanya dampak negatif, penelitian dilakukan dengan prinsip 3R, yaitu:

1. *Reduction*: penelitian ini memanfaatkan hewan uji dengan jumlah yang minimal, tetapi akan mendapatkan hasil yang maksimal. Penelitian ini

menggunakan sampel sesuai dengan rumus Mead yaitu $E=n \cdot t$, dengan n adalah jumlah hewan dan t adalah jumlah perlakuan.

2. *Refinement*: selama penelitian berlangsung, hewan uji diletakkan di kandang mencit yang digunakan berupa bak plastik dengan luas alas kandang $77,4 \text{ cm}^2$ dan tinggi $12,7 \text{ cm}$ menggunakan tutup kandang. Kebersihan kandang dijaga dengan baik dan mencit diberi makan dan minum setiap hari, serta ditempatkan di lingkungan yang bersih, suhu yang sesuai dengan standar, dan bersirkulasi lancar. Selain itu harus ada 5 prinsip *freedom* yaitu, *freedom from hunger and thirst* yang artinya mencit harus bebas dari rasa lapar dan haus dengan cara diberikan makan setiap hari, *freedom from discomfort* yang artinya mencit harus bebas dari rasa tidak nyaman dengan cara kandang dibersihkan setiap 2 minggu sekali, *freedom from pain, injury and disease* yang artinya mencit harus bebas dari rasa sakit, luka dan penyakit dengan cara perlakuan oleh orang yang berkompeten dan profesional, *freedom from fear and distress* yang artinya mencit harus bebas dari rasa takut dan stress dengan cara adaptasi lingkungan baru selama seminggu, *freedom to express natural behavior* yang artinya mencit harus bebas untuk mengekspresikan tingkah dengan cara mencit bebas bergerak di dalam kandang.
3. *Replacement*: penelitian ini menggunakan mencit sebagai hewan uji coba pengganti manusia. Pemilihan mencit karena memiliki karakteristik yang sama dengan manusia dan merupakan organism dengan ordo yang rendah.