

BAB III

SUBJEK DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek dan Bahan Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus Musculus L*) galur *Swiss Webster* dengan kriteria inklusi: mencit jantan dewasa (8-10 minggu), yang memiliki berat: 25–35gram, belum pernah kawin, kondisi sehat, tidak ada luka, bergerak aktif, dan responsif. Adapun kriteria eksklusi yaitu mencit yang pernah menjadi hewan coba sebelumnya.

3.1.1 Penentuan Besar Sampel Penelitian

Besar sampel pada penelitian ini dihitung dengan menggunakan “*Mead Equation*” atau “*resource equation*”.^{28,29} Adapun rumus untuk persamaan tersebut adalah

$$E = N - T$$

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

N = jumlah total hewan coba ($N = n \times T$)

T = jumlah perlakuan

n = jumlah hewan coba per kelompok perlakuan

Berdasarkan rumus tersebut akan diperoleh besar sampel minimum dan maksimum sebagai berikut:

$$N_{\text{minimum}} = E_{\text{minimum}} + T$$

$$= 10 + 5$$

$$= 15$$

$$N_{\text{maksimum}} = E_{\text{maksimum}} + T$$

$$= 20 + 5$$

$$= 25$$

$$\text{maka } n = \frac{N}{T} = \frac{15}{5} = 3$$

$$\text{maka } n = \frac{N}{T} = \frac{25}{5} = 5$$

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 ($E = 15$)³⁰ sehingga jumlah sampel yang diperoleh adalah

$$E = N - T$$

$$15 = N - 5$$

$$15 + 5 = N$$

$$20 = N$$

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

Berdasarkan rumus tersebut didapatkan $n \geq 4$ ekor/perkelompok. Jadi jumlah sampel minimal sesuai rumus persamaan mead adalah 4. Untuk menjaga agar tingkat representatifnya tinggi apabila terjadi drop out, maka sampel ditambah 10% yaitu menjadi 5 ekor setiap kelompoknya. Jadi jumlah seluruh sampel adalah 5 ekor x 5 kelompok = 25 ekor mencit.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah tomat sayur lokal. Tomat yang dipilih adalah tomat berwarna merah. Tomat didapatkan dari perkebunan tomat di Desa Cikitu, Kabupaten Bandung dan asap rokok menggunakan rokok kretek yang akan diberikan pada kandang dalam keadaan mencit di luar dari kandang.

3.1.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan selama penelitian adalah sebagai berikut:

1. Kandang Mencit

Kandang mencit berukuran 28x34x14 cm bahan dari *plexi glass*. Kandang mencit beralaskan serbuk kayu untuk menyerap urin dan kotoran hewan coba. Pembersihan kandang dan penggantian sekam dilakukan paling sedikit tiga kali sehari.

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

Jarum suntik yang digunakan untuk memberikan jus tomat secara peroral dengan ukuran 1 cc/ml.

6. Juice maker

Juice maker digunakan untuk membuat jus tomat yang akan diberikan kepada mencit.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni *in vivo* dengan rancangan acak lengkap. Subjek penelitian yang digunakan adalah mencit jantan dewasa yang dibagi secara acak dengan menggunakan tanda lalu di acak berdasarkan hasil format dalam excel menjadi lima kelompok, yaitu kelompok normal (K normal), kelompok kontrol negatif/K (-), kelompok perlakuan 1 (K1), kelompok perlakuan 2 (K2), dan kelompok perlakuan 3 (K3).

3.2.2 Variable Penelitian

3.2.2.1 Identifikasi Variabel

Variabel dibagi menjadi 3 yaitu:

1. Variabel bebas (*independent*)

Jus tomat yang diberikan pada hewan coba dengan dosis 0,16mL, 0,32mL, dan 0,64mL.³

2. Variabel terikat (*dependent*)

Kualitas sperma mencit (jumlah, motilitas, dan morfologi).

3. Variabel terkontrol yang sesuai dengan galur mencit, jenis kelamin mencit, umur mencit, berat badan mencit, makanan mencit, minuman mencit, pencahayaan kandang, dan ventilasi kandang.

3.2.2.2 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini tersaji dalam tabel 3.1 sebagai berikut:

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hail Ukur	Skala Ukur
1.	Jus Tomat	Tomat yang dipilih adalah tomat yang berwarna merah. Sebelum di jus menggunakan <i>juicer</i> , tomat berdiameter 3,74–5,34 cm direbus dalam air mendidih dengan volume air 500g buah tomat segar/1L ³² selama satu menit. Jus diberikan secara oral selama 14 hari	Gelas ukur	Jus tomat yang diberikan pada penelitian ini ³ adalah: 1. K1:0,16mL/mencit /hari 2. K2:0,32mL/mencit /hari 3. K3:0,64mL/mencit /hari	Rasio

		kepada setiap mencit. ^{33,34}			
2.	Asap Rokok Tersier	Kandang yang sudah disiapkan akan diberikan paparan asap rokok selama 14 hari ^{33,34} dengan durasi 20-30 menit menggunakan rokok kretek dalam keadaan kandang kosong, setelah diberikan asap rokok mencit dimasukan kedalam kandang.	Pengamatan visual	- 0: yang tidak diberi paparan asap rokok - 1: yang diberi paparan asap rokok	Nominal
3.	Jumlah Sperma	Banyaknya jumlah sperma adalah sekitar 35 juta—200 juta, yang dihitung dengan cara kolom hitung minimal 100 sperma/lapang pandang. Jumlah sperma subfertil ⁴⁵ adalah <20 juta setelah melakukan hubungan seksual.	<i>Improved neubauer</i>	Jumlah sperma dalam satuan juta/mL	Rasio
	Morfologi sperma	Bentuk sperma normal terdiri	Mikroskop cahaya	Jumlah sperma normal dalam %	Rasio

atas kepala dan ekor.¹¹

Sedangkan bentuk sperma abnormal meliputi kelainan fisik, memiliki dua kepala, bentuk kepala yang tidak normal, atau ekor yang tidak normal.

Motilitas sperma	Kemampuan sperma normal bergerak dalam medium cair. ¹¹	Mikroskop cahaya	Jumlah % sperma yang:	Rasio
	Sperma abnormal seperti bergerak lambat, tidak bergerak pada garis lurus, atau keduanya. ¹⁴		1. Bergerak baik (a), 2. Bergerak ditempat atau berkelok (b), 3. Tidak bergerak (c).	

3.2.3 Prosedur Penelitian

3.2.3.1 Pembuatan Jus Tomat

Tomat yang dipilih adalah tomat yang berwarna merah. Sebelum di jus menggunakan *juicer*, tomat yang berdiameter 3,74–5,34 cm²⁵ direbus dalam air mendidih dengan volume air 500g buah tomat segar/1L³² selama satu menit untuk mendapatkan kadar likopen lima kali lebih tinggi dibandingkan dengan tomat yang

tidak direbus.²⁷ Sebanyak 0,16mL, 0,32mL, dan 0,64mL jus diberikan secara oral selama 14 hari kepada setiap mencit.³

3.2.3.2 Penentuan Volume Jus Tomat

Volume jus tomat yang digunakan adalah volume maksimal pada mencit (1 cc/ml/hari/mencit). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Handaru (2010)³ dosis yang digunakan adalah 1,15mL/tikus untuk K1, 2,3mL/tikus untuk K2, dan 4,6mL/tikus untuk K3. Berdasarkan hasil tersebut, penelitian ini akan menggunakan dosis yang sudah dikonversi untuk dosis mencit yaitu 0,16 mL/mencit untuk kelompok perlakuan 1 (K1), kelompok perlakuan 2 (K2) adalah 0,32 mL/mencit, dan kelompok perlakuan 3 (K3) adalah 0,64 mL/mencit.

3.2.3.3 Perlakuan Pada Hewan Coba

Pada penelitian ini hewan coba yang telah memenuhi sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi selanjutnya akan diberikan perlakuan diantaranya yaitu:

1. Aklimatisasi Hewan Coba

Sebelum masa perlakuan, dilakukan masa aklimasi selama tujuh hari. Periode ini bertujuan mengadaptasi mencit ke kondisi penelitian. Selama aklimasi, subjek penelitian diberikan pakan standard dan air minum secara *ad libitum*. Mencit yang sakit ketika dan setelah periode ini, tidak diikutsertakan dalam penelitian.

2. Pembagian Kelompok Percobaan

Sebanyak 25 mencit jantan dibagi menjadi lima kelompok secara acak, yaitu kelompok kontrol normal (K normal) yang tidak diberi jus tomat dan tidak mendapat paparan asap rokok tersier, kelompok kontrol negatif/K (-) yang mendapat paparan asap rokok tersier dan tidak diberi jus tomat, kelompok perlakuan 1 (K1) yang diberi jus tomat sebanyak 0,16mL/hari dan mendapat paparan asap rokok tersier, kelompok perlakuan 2 (K2) yang diberi jus tomat sebanyak 0,32mL/hari dan mendapat paparan asap rokok tersier, kelompok perlakuan 3 (K3) yang diberi jus tomat sebanyak 0,64mL/hari dan mendapat paparan asap rokok tersier. Kelompok perlakuan yang diberi jus tomat akan diberi selama empat belas hari berturut-turut.

3. Pemaparan Asap Rokok Tersier terhadap Induk Jantan

Pemberian asap rokok tersier dilakukan dengan cara mengasapi kandang hewan coba dengan rokok kretek. Selama proses pengasapan kandang, hewan coba dipindahkan ke kandang lain dan dilakukan di tempat terpisah dengan area pemeliharaan hewan coba, sehingga hewan coba tidak terpapar asap rokok secara langsung. Satu batang rokok/kandang/hari dibakar dan asapnya dibiarkan melingkupi kandang mencit perlakuan. Hal ini dilakukan setiap hari selama empat belas hari.^{33,34}

4. Pemeriksaan Parameter Penelitian

Setelah mencit jantan dewasa tersebut dimasukan kedalam kandang yang diberi paparan asap rokok tersier, maka akan dilakukan penilaian dari Kualitas Sperma berupa jumlah, motilitas, dan morfologi dengan cara dikorbkan melalui

dislokasi *cervical* dan dibedah untuk mengambil bagian kauda epididimisnya.

Selanjutnya dilakukan penilaian dengan rumus²³:

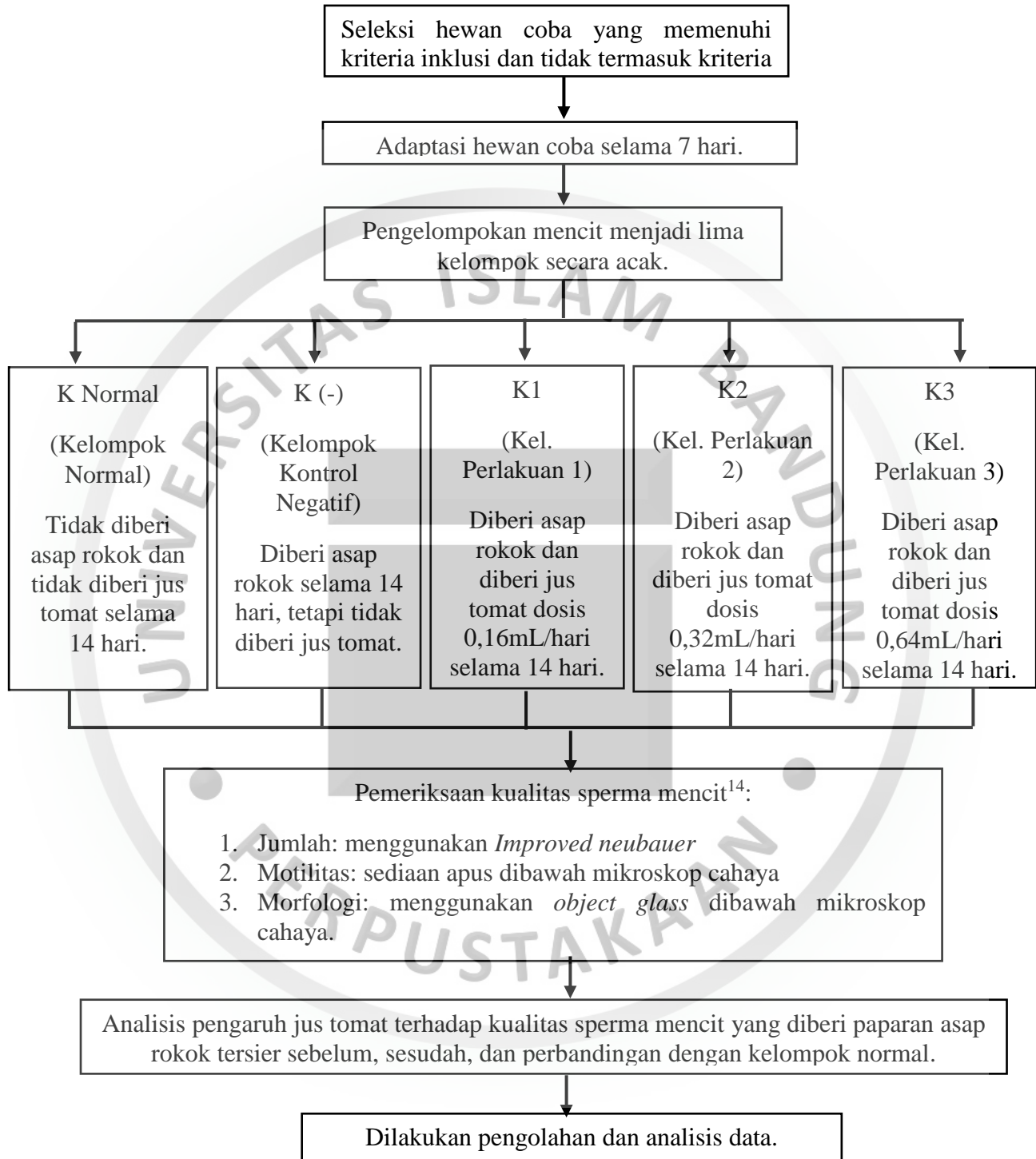
$$\frac{a - b}{a} \times 100\%$$

Keterangan: a = jumlah sperma yang dihitung (100)

b = sperma yang tidak bergerak/abnormal

kualitas sperma normal apabila jumlah sperma 20 juta/ml atau lebih dengan cara menghitung melalui *Improved Neubauer* yang setiap lapang pandang dihitung minimal 100 sperma di setiap ulangan yang terdiri dari kepala dan leher²⁴, kepala berbentuk oval, leher dan ekor utuh dengan morfologi normal $\geq 30\%$ yang dilakukan sediaan apus lalu dianalisis menggunakan mikroskop cahaya dan dihitung menggunakan rumus diatas, bergerak cepat, bergerak pada garis lurus¹⁴ dengan motilitas normal sperma $> 50\%$ yang ditaruh di *object glass* dan ditutup dengan *cover glass* lalu dianalisis menggunakan mikroskop cahaya¹⁴ dan dihitung menggunakan rumus diatas.

3.2.3.4 Prosedur Penelitian



3.2.4 Pengolahan dan Analisis Data

Analisis data bertujuan untuk menggambarkan karakteristik subjek penelitian yang meliputi jumlah, motilitas, dan morfologi terhadap efek tomat yang diberikan pada mencit yang diberi paparan asap rokok tersier. Sebelum dilakukan analisis statistik dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji Shapiro Wilks untuk melihat distribusi data dan uji homogenitas. Apabila hasil dari uji normalitas data terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan analisis data menggunakan uji parameterik Anova One Way. Apabila data tidak berdistribusi normal dan tau tidak homogen maka dilakukan uji non-parameterik Kruskal Wallis. Kemudian apabila terdapat perbedaan yang signifikan dari hasil uji anova one way atau kruskal wallis, maka akan dilakukan uji Post Hoc. Selang kepercayaan 95% (α 0,05).

3.2.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret–Juli 2019 di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung Jl. Tamansari No. 22.

3.2.6 Aspek Etika Penelitian

Penelitian ini menggunakan mencit sebagai subjek yang akan diberikan perlakuan. Setiap penelitian yang menggunakan hewan percobaan secara etis harus menerapkan prinsip umum etika penelitian kesehatan dan prinsip 3R, yaitu:

1. *Replacement*

Replacement adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur, karena mencit hampir identik secara genetik, secara taksonomi hewan yang paling rendah, dan mudah didapat. Penelitian ini menggunakan mencit galur *Mus Musculus L* karena dapat berkembang biak dengan baik dan bukan hewan langka.

2. *Reduction*

Reduction diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian dengan jumlah seminim mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah minimum biasa dihitung dengan menggunakan rumus Persamaan Mead yaitu $E=N-T$, dengan E adalah derajat kebebasan, N adalah jumlah hewan yang diperlukan dan T adalah jumlah kelompok perlakuan.

Pada penelitian ini, jumlah sampel dihitung dengan menggunakan rumus Persamaan Mead. Jumlah minimal yang didapat dari rumus tersebut adalah 5 ekor mencit pada masing-masing kelompok, sehingga total mencit yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 25 ekor.

3. *Refinement*

Refinement adalah memperlakukan hewan coba sesuai dengan standar, memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisir perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. 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 diberi makan dan minum setiap hari dengan memberikan akses makanan dan air minum sesuai dengan jumlah dan komposisi yang sesuai untuk kesehatannya, *freedom from discomfort* dengan cara membersihkan kandang setiap 2 minggu sekali, *freedom from pain, injury, and disease* dengan cara diberikan perlakuan oleh orang yang berkompeten profesional, *freedom from fear and distress* dengan cara adaptasi lingkungan baru selama seminggu, dan *freedom to express natural behavior* dengan cara bebas bergerak di dalam kandang.