

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan model penelitian eksperimental kuasi dengan *posttest only control group design* untuk menilai jumlah spermatozoa tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) pada setiap kelompok percobaan, baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan yang diberikan probiotik dan mentega putih dengan metode sondase sebagai penginduksi hiperkolesterolemia.

#### **3.2. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan selama 11 minggu yang terdiri dari adaptasi tikus selama 1 minggu dan perlakuan selama 10 minggu di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

#### **3.3. Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **3.3.1. Populasi Penelitian**

Populasi penelitian yang digunakan adalah cairan sperma dari organ kauda epididimis tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang sebelumnya mendapat perlakuan.

##### **3.3.2. Sampel Penelitian**

Sampel penelitian yang digunakan adalah 19 buah organ kauda epididimis tikus putih *strain* Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan. Organ kauda epididimis kanan yang digunakan merupakan bahan biologi tersimpan yang telah mendapatkan perlakuan dan didapatkan dari penelitian Lusiantari, *et al* (2017) dengan judul “Pengaruh Pemberian

Probiotik terhadap Ekspresi Reseptor Endothelin-B dan Kadar Malondialdehid (MDA) Otak pada Tikus Model Hiperkolesterolemia yang Diinduksi Mentega Putih”. Penelitian tersebut menggunakan tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dengan kisaran usia dua bulan dan berat badan sekitar 100-200 gram, anatomis lengkap dan bergerak aktif. Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah hewan coba yang mati selama penelitian berlangsung.

Tikus ditimbang dan dipilih yang memenuhi kriteria inklusi, kemudian dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok, yaitu:

- a. Kelompok kontrol negatif (C-), diberikan pakan standar selama 10 minggu.
- b. Kelompok kontrol positif (C+), diberikan pakan standar dan diet mentega putih 1:5 (3 cc) selama 10 minggu. Mentega putih diberikan per oral menggunakan sonde.
- c. Kelompok perlakuan 1 (T1), diberikan pakan standar, diet mentega putih 1:5 (3 cc), dan probiotik dosis  $1,65 \times 10^9$  Cfu/kg (0,14 gram) selama 10 minggu. Mentega putih dan probiotik diberikan per oral menggunakan sonde.
- d. Kelompok perlakuan 2 (T2), diberikan pakan standar, diet mentega putih 1:5 (3 cc), dan probiotik dosis  $5,5 \times 10^9$  Cfu/kg (0,12 gram) selama 10 minggu. Mentega putih dan probiotik diberikan per oral menggunakan sonde.
- e. Kelompok perlakuan 3 (T3), diberikan pakan standar, diet mentega putih 1:5 (3 cc), dan probiotik dosis  $1,65 \times 10^{10}$  Cfu/kg (0,42 gram) selama 10 minggu. Mentega putih dan probiotik diberikan per oral menggunakan sonde.

Penentuan jumlah hewan coba dapat dihitung menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

$$E = N - T$$

N: jumlah hewan coba tiap kelompok x jumlah kelompok perlakuan

T: jumlah kelompok perlakuan

Angka “E” optimal apabila rentang antara 10 hingga 20 (Charan et al., 2013).

Diketahui  $T=5$ ,  $N=5n$  ( $n$ : jumlah hewan coba tiap kelompok), maka rumus  $E=5n-5$ .

- Jika  $E = 10$   
 $10 = 5n - 5$   
 $15 = 5n$   
 $n = 3$
- Jika  $E = 20$   
 $20 = 5n - 5$   
 $25 = 5n$   
 $n = 5$

Pada penelitian ini digunakan 4 ekor tikus pada tiap kelompok perlakuan sehingga telah memenuhi syarat jumlah sampel.

### 3.4. Variabel Penelitian

#### 3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah probiotik dosis  $,65 \times 10^9$  Cfu/kg (0,04 gram),  $5,5 \times 10^9$  Cfu/kg (0,12 gram), dan  $1,65 \times 10^{10}$  Cfu/kg (0,4 gram) melalui sondase selama 10 minggu (Kim et al., 2017).

#### 3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah spermatozoa tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*).

### 3.5. Definisi Operasional

#### 3.5.1. Probiotik

Probiotik merupakan bahan antioksidan yang mengandung bakteri *Lactobacilus acidophilus* sebanyak  $4,7 \times 10^7$  cfu/gram. Probiotik diberikan pada kelompok perlakuan 1 (T1), kelompok perlakuan 2 (T2), dan kelompok perlakuan 3 (T3) menggunakan probiotik merk lacto-B. Probiotik ini mengandung campuran bakteri asam laktat *L. acidophilus*, *B. longum*, dan *S.thermophilus*, serbuk krim nabati, susu mineral konsentrat, vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, vitamin C, niasin, dan oksida zink yang dicairkan aquadest 0,5 cc dengan dosis masing-masing secara berurutan  $1,65 \times 10^9$  Cfu/kg,  $5,5 \times 10^9$  Cfu/kg, dan  $1,65 \times 10^{10}$  Cfu/kg melalui sondase selama 10 minggu (Kim *et al.*, 2017).

#### 3.5.2. Mentega putih

Mentega putih merupakan produk yang berasal dari campuran lemak hewani dan lemak nabati, produk ini mengandung lebih banyak lemak jenuh daripada kandungan air. Induksi hiperkolesterolemia pada hewan coba pada penelitian ini menggunakan mentega putih dengan merk Sari Tanny yang mengandung minyak nabati, pangemulsi nabati, antioksidan Askorbil Palmitat dan Tokoferol. Metega putih terlebih dahulu diencerkan dengan cara dipanaskan dalam cawan menggunakan kompor listrik, lalu didiamkan agar tidak terlalu panas. Mentega putih yang telah dipanaskan diambil sebanyak 1,5 cc menggunakan spuit dan dicampur dengan probiotik yang telah dilarutkan sebanyak 0,5 cc.,kemudian diberikan pada hewan coba kelompok, T1, T2 dan T3 secara sonde ke dalam lambung.

### 3.5.3. Jumlah Spermatozoa Tikus Jantan Galur Wistar

Jumlah spermatozoa adalah banyaknya spermatozoa yang diperoleh dari kauda epididimis kanan tikus jantan galur Wistar ( *Rattus noveigicus* ) yang dihitung dalam sperma/ml suspensi. Sperma/ml suspensi dibuat dengan memotong kauda epididimis kanan tikus jantan galur Wistar menjadi beberapa bagian kecil kemudian diletakkan di cawan petri yang berisi 1 m l larutan PBS. Kemudian tunggu selama 10 menit, hasilnya yaitu sperma dari kauda epididimis yang telah hancur akan keluar menyatu dengan larutan PBS, sehingga terbentuk suspensi sperma.

## 3.6. Instrumen Penelitian (Alat dan Bahan)

### 3.6.1. Alat Penelitian

- a. Kendang hewan coba dengan tempat makan dan minum
- b. Sonde lambung
- c. Timbangan merk adam
- d. Set alat bedah untuk terminasi hewan coba
- e. Sarung tangan
- f. Cawan petri
- g. Mikroskop cahaya
- h. *Glass object*
- i. Pipet ertirosit
- j. *Haemocytometer (bilik hitung sel etrosit)*
- k. Gelas ukur

### 3.6.2. Bahan Penelitian

- a. Pakan standar merk Comfeed
- b. Probiotik Lacto-B
- c. Mentega putih merk Sari Tanny
- d. Organ kauda epididimis kanan tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang telah mendapat perlakuan sebanyak 19 buah.

- e. Bahan-bahan untuk pemeriksaan jumlah spermatozoa tikus, antara lain: larutan PBS, larutan Aquades, dan larutan NaCl.

### **3.7. Alur Penelitian**

#### **3.7.1. Terminasi**

Proses terminasi dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Menggunakan teknik perfusi, teknik perfusi merupakan salah satu metode fiksasi. Metode perfusi merupakan fiksasi jaringan atau organ melalui aliran darah. Tahapan proses perfusi adalah sebagai berikut :

1. Tikus dibius dengan anastesi ringan menggunakan ketamin dengan dosis 0,1 mg/kgbb
2. *Dipinning* pada kaki tikus yang akan dibedah
3. Perut mencit diusap dengan alcohol 70%
4. Bagian perut tikus dibedah dengan scalpel hingga bagian rusuk terbuka
5. Atrium jantung dilubangi dengan gunting atau pinset
6. Darah dibiarkan keluar
7. Larutan NaCl disuntikkan ke bagian bilik kiri
8. Pengambilan organ testis kanan pada tikus wistar
9. Pengambilan kauda epididymis kanan
10. Diletakkan di cawan petri
11. Dilakukan pembuatan suspensi sperma

#### **3.7.2. Pembuatan suspensi sperma**

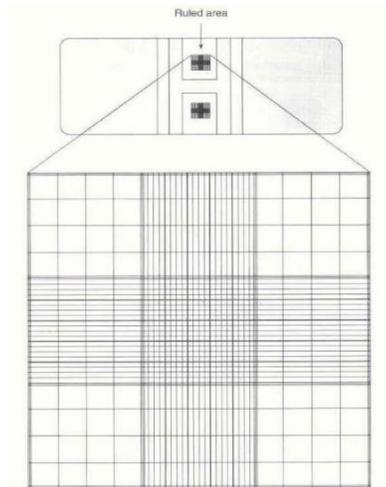
Setelah terminasi, epididymis dari testis kanan tikus diambil sekitar 1-2 cm di bawah caput epididymis dan diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi 1 ml PBS, kemudian potong menjadi bagian-bagian kecil hingga tampak terlihat cairan putih mengalir keluar dan menyatu bersama

cairan PBS. Diamkan dalam suhu kamar 10 menit agar sperma dapat keluar dari lumen epididimis seluruhnya. Kemudian lakukan homogenisasi pada suspensi tersebut dengan cara diaduk.

### 3.7.3. Perhitungan jumlah sperma

Suspensi sperma yang telah dihomogenisasi diambil menggunakan pipet eritrosit hingga mencapai angka 0,5, dan dilanjutkan dengan menghisap larutan PBS hingga angka 11. Kemudian pipet eritrosit digojog pelan agar sperma menjadi lebih homogen. Beberapa tetesan awal dibuang, lalu teteskan sperma keatas *haemocytometer* (bilik hitung) pada kedua sisi yang telah ditutup menggunakan kaca penutup terlebih dahulu. Selanjutnya perhitungan jumlah sperma dilakukan dengan cara menghitung banyaknya sperma dalam lima kotak 0,4 x 0,4 mm (A, B, C, D, dan E) (Gambar 9) dari kedua sisi *haemocytometer* dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Jumlah sperma dihitung dengan menggunakan rumus :

Jumlah sperma = jumlah sperma pada 5 kotak x 5 (juta sel/ml)



Gambar 9. Bilik hitung untuk pemeriksaan jumlah sperma (Perhizkar *et al.*, 2013)

### **3.8. Analisis Data**

Analisis data dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *software* SPSS. Pertama, dilakukan Uji normalitas dilakukan dengan uji Saphiro Wilk dilanjutkan dengan uji *Levene Test* untuk menilai homogenitas data. Jika distribusi data normal, maka dilakukan uji analisis *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dan dilanjutkan dengan uji *post hoc Bonferroni*. Jika distribusi data tidak normal, maka dilakukan analisis statistik dengan uji non parametrik *Kruskall Willis*. Jika hasil uji statistik tersebut terdapat perbedaan yang bermakna, maka dilakukan uji *Mann Whitney*. Perbedaan disebut bermakna apabila nilai  $p < 0,05$  (Dahlan, 2014).

### **3.9. Etika Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan dengan mengajukan persetujuan kepada Komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Selain itu, protokol penelitian untuk perlakuan hewan coba yang dilakukan oleh Lusiantari *et al.*, (2017) telah mendapatkan persetujuan Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.