

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Jurusan Biologi Fakultas MIPA UNDIP pada bulan Mei - Juli 2004.

3.2 Bahan

3.2.1 Bahan uji

Serbuk akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) yang diperoleh di kios jamu X di Semarang.

3.2.2 Hewan percobaan

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan berumur 35 hari dengan berat badan berkisar antara 20-35 gram, hewan dipelihara di Lab. BSF jurusan biologi-UNDIP. Mencit diberi pakan standar dan air minum yang diberi secara *ad libitum*.

3.3 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah kandang pemeliharaan dan perlengkapannya, timbangan hewan, timbangan digital, jarum gavage, seperangkat alat pembuatan sediaan histologis dengan metode parafin dan pewarna Haematoksilin dan Eosin (HE), mikroskop dan mikrometer.

3.4 Cara kerja

3.4.1 Aklimasi mencit

Aklimasi dilaksanakan selama 2 minggu untuk membiasakan mencit hidup dalam lingkungan dan perlakuan baru. Setiap hari mencit diberi makan dan minum secukupnya disertai dengan pengamatan umum, yaitu mencit yang tampak sakit tidak diikutsertakan dalam penelitian. Tanda mencit sakit adalah berkurangnya aktivitas, lebih banyak diam dan bulu-bulunya banyak yang berdiri.

3.4.2 Konversi dosis dan pembuatan larutan bahan

Dosis diperoleh berdasarkan tabel konversi perhitungan dosis antar hewan (Laurence and Bacharach, 1964), dimana konversi dosis tikus ke mencit adalah 0,14. Satayavivad *et al.* (1998) yang menyatakan bahwa dosis 200mg/ kg bb pada mencit sebagai dosis yang aman yang tidak menyebabkan racun, dan pada penelitian terdahulu oleh Ang *et al.* (2000) dosis 200 mg/ kg bb pada tikus dapat meningkatkan libido atau aktivitas reproduksi, sehingga dosis ini yang dipakai. Maka dosis yang digunakan untuk mencit berdasarkan hasil konversi adalah $0,14 \times 200 \text{ mg /kg bb} = 28 \text{ mg/kg bb}$ mencit, untuk mencit yang beratnya 20 gram dosis yang digunakan adalah 0,56 mg/mencit.

Pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) sebanyak 56 mg di campurkan dengan 100 ml aquades, kemudian dididihkan. Setelah agak dingin larutan disaring dengan kertas saring. Hasil yang diperoleh merupakan larutan pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) dengan dosis 0,56 mg/ml. Larutan dengan dosis 0,56 mg/ml diencerkan dengan perbandingan volume 1:1 untuk menghasilkan larutan pasak bumi dengan dosis 0,28 mg/ml. Dosis 0,14 mg/ml diperoleh dari

pengenceran larutan pasak bumi dosis 0,28 mg/ml dengan perbandingan volume 1:1. Pemberian larutan masing-masing perlakuan setiap satu kali sehari selama 48 hari.

3.4.3 Perlakuan

Pemberian larutan serbuk akar pasak bumi secara oral dengan menggunakan jarum "gavage" dengan volume 1 ml/ hewan percobaan. Ritscel (1974) menyatakan dosis volume maksimum larutan sediaan uji yang dapat diberikan pada mencit 1 ml, dengan ketentuan :

P0 : Kontrol, hanya diberi akuades

P1 : Pemberian pasak bumi dosis 0,14 mg/ml/ekor/hari

P2 : Pemberian pasak bumi dosis 0,28 mg/ml/ekor/hari

P3 : Pemberian pasak bumi dosis 0,56 mg/ml/ekor/hari

3.4.4 Pengukuran bobot badan, bobot testis dan isolasi testis

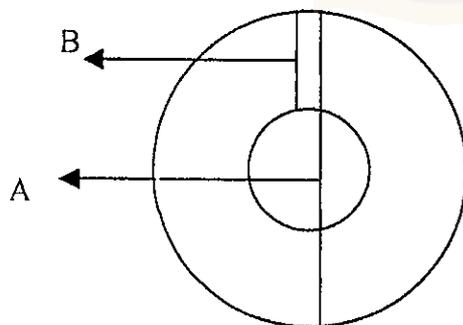
Bobot badan awal mencit ditimbang setelah akhir aklimasi yaitu pada awal perlakuan selanjutnya dilakukan penimbangan bobot badan setiap 1 minggu sekali. Pertambahan bobot badan dihitung sebagai selisih antara bobot badan pada minggu terakhir dengan bobot badan awal. Selanjutnya pada akhir perlakuan hewan uji dibunuh dengan cara dislokasi leher. Dislokasi dilakukan dengan menarik ekor dan leher secara bersamaan dengan jari kemudian dilakukan pembedahan dan isolasi testis. Testis yang telah diisolasi lalu ditimbang, setelah ditimbang testis difiksasi untuk dibuat sediaan histologis dengan metode parafin.

3.4.5 Pembuatan sediaan histologis testis

Pembuatan sediaan dengan menggunakan metode parafin dengan pewarnaan Hematoksin dan Eosin (HE). Testis difiksasi dalam larutan Bouinn selama satu hari, selanjutnya didehidrasi dengan alkohol bertingkat. Selanjutnya testis diinfiltrasi dan ditanam dalam parafin, lalu disayat dengan ketebalan 6 μm dan sayatan ditempel pada kaca objek yang telah diolesi dengan Meyer albumin. Sayatan yang sudah ditempel diwarnai dengan pewarnaan Haematoksin dan Eosin.

3.4.6 Pengukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus

Pengukuran dilakukan pada tubulus seminiferus yang tersayat bulat, kemudian dilakukan pengamatan untuk masing-masing potongan testis. Pengukuran diameter dan tebal epitel dengan menggunakan mikrometer okuler dan pengamatan dibawah mikroskop dengan pembesaran 40x10. Tebal epitel tubulus seminiferus diukur dari sel spermatogonium sampai sel spermatid. Yatim (1990) dan Holstein *et al.* (2003) menyatakan epitel tubulus seminiferus terdiri dari sel spermatogonium, spermatosit dan spermatid.



Gambar 05. Cara mengukur diameter tubulus seminiferus dan tebal epitel tubulus seminiferus
Keterangan : A = Diameter tubulus seminiferus, B= Tebal epitel tubulus seminiferus

3.5 Parameter

Parameter utama yang diamati adalah :

1. Bobot testis
2. Diameter tubulus seminiferus
3. Tebal epitel tubulus seminiferus

Parameter pendukung adalah :

1. Bobot badan
2. Suhu.

3.6 Analisis data

Penelitian menggunakan metode eksperimental, dimana semua kondisi lingkungan diatur sedemikian rupa sehingga stabil dan homogen. Data yang telah diperoleh diuji homogenitas dan normalitasnya. Data yang telah homogen dan normal dilanjutkan ke Anova untuk melihat apakah ada perbedaan yang nyata antar perlakuan. Pada data diameter tubulus seminiferus terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan, selanjutnya dilakukan uji lanjut menggunakan BNJ pada taraf signifikansi 95%, sedangkan tebal epitel tubulus seminiferus, bobot testis dan bobot badan menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan, maka tidak dilakukan uji lanjut BNJ.