

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan dikelompokkan menjadi 5 kelompok dengan 5 kali ulangan.

Perlakuan yang digunakan terdiri dari:

1. Kelompok K⁻ : Kelompok kontrol negatif sebanyak 5 ekor mencit tanpa dipapar timbal (Pb) Asetat dan tanpa diberi ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*).
2. Kelompok K⁺ : Kelompok kontrol positif sebanyak 5 ekor mencit yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB dan tanpa diberi ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 0 mg/gr BB per hari.
3. Kelompok D1: Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB dan diberi ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 0,6 mg/gr BB per hari.
4. Kelompok D2: Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB dan diberi ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 1,2 mg/gr BB per hari.
5. Kelompok D3: Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB dan diberi ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 2,4 mg/gr BB per hari.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel bebas : Ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*), dengan dosis 0,6 mg/kg BB, 1,2 mg/kg BB, 2,4 mg/kg BB, per hari. Kemudian Timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB.
2. Variabel tergantung : Integritas membran spermatozoa dan *Malondialdehid* (MDA)
3. Variabel kendali : Mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c, jenis kelamin jantan dengan berat badan 15-32 gr, usia 2-3 bulan sebanyak 25 ekor, jintan hitam (*Nigella sativa*), Pakan dan minum mencit.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2014 di Laboratorium Fisiologi hewan dan biosistem jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Populasi dan Sampel

Hewan uji yang dipakai adalah mencit Balb/c (*Mus musculus* L) dengan 5 kelompok perlakuan masing-masing 5 ekor. Jenis kelamin jantan, umur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 15-32 gram sebanyak 25 ekor.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba (bak plastik), tempat makan dan minum mencit, alat pencekok oral (sonde modifikasi),

timbangan analitik, hot plate, labu ukur, gelas ukur, beaker glass, tabung efendorf, tabung erlenmeyer, hemositometer, obyek glass, hand counter, pipet tetes, seperangkat alat bedah, rotari evaporator, mikroskop computer, kaca preparat, kapas, dan spidol permanen.

3.5.2 Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah mencit, serbuk biji jintan hitam (*Nigella sativa*), aquades, pakan mencit berupa pelet, Na CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*), NaCl fisiologis, pewarna eosin 1%, negrosin 10%, kloroform, alkohol 70%, 4,5 ml larutan pembengkak (0,735 gram *sodium citrat dihydrate* ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dan 1,351 gram fruktosa dalam 100 ml air destilasi

3.6 Prosedur Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi 3 tahap, yaitu:

1. Tahap persiapan: tahap yang meliputi persiapan hewan coba (aklimatisasi), pembuatan ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*) pembuatan larutan Na CMC 1%, pembuatan larutan timbal (Pb) serta penentuan dosis perlakuan.
2. Tahap pelaksanaan: tahap yang meliputi pengelompokkan dan perlakuan hewan coba.
3. Tahap pengambilan data: tahap yang meliputi perhitungan Integritas membran spermatozoa dan kadar *Malondialdehyde* (MDA).

3.6.1 Persiapan Perlakuan

3.6.1.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dilakukan, hal-hal yang perlu dipersiapkan adalah tempat pemeliharaan hewan coba yang meliputi kandang, serutan kayu, tempat pakan dan minum mencit. Selanjutnya, hewan coba diaklimatisasi sebelum

perlakuan dilakukan selama satu minggu. Mencit diberi pakan dan minum secara ad libitum (berlebih).

3.6.1.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Jintan Hitam (*Nigella sativa*)

Sampel yang digunakan adalah serbuk biji jintan hitam (*Nigella sativa*) sebanyak 100 gram. Selanjutnya dimaserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3 kali sambil diaduk sesekali selama 24 jam.

Serbuk yang telah dimaserasi disaring dengan corong buncher. Filtrat yang telah diperoleh dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 40⁰C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya disimpan dan digunakan sebagai perlakuan.

3.6.1.3 Pembuatan Sediaan Larutan Na CMC 1 %

Sediaan larutan Na CMC 1% dibuat dengan menaburkan 1gr Na CMC ke dalam 100 ml aquades, kemudian diaduk hingga homogen kemudian dipanaskan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai gel. Selanjutnya diencerkan dalam labu ukur dengan aquades hingga volume 100 ml.

3.6.1.4 Perhitungan Dosis Timbal Asetat 0,3 mg/gr Berat Badan Mencit

A. Jumlah Timbal Asetat Yang Dibutuhkan

$0,3 \text{ mg/gr} = 0,0003 \text{ gr/gr}$ (satunya adalah berat badan mencit). Rata-rata berat badan mencit yang digunakan adalah 20 gram, maka timbal yang dibutuhkan tiap mencit adalah $0,0003 \times 20 = 0,006 \text{ gram/ mencit}$. Jadi jumlah timbal asetat yang dibutuhkan untuk 20 mencit adalah $0,006 \times 20 = 0,12\text{gram}$. Akan tetapi dikarenakan dalam praktiknya harus dlebihkan maka timbal asetat total stok ditambah hingga menjadi sebanyak 0,15gram.

B. Dosis Stok

Volume sonde (ml) x jumlah mencit (ekor) x lama pemberian (hari)

0,5 (volume sonde) x 20 ekor mencit x 7 hari = 70 ml

Total stok adalah sebanyak 70 ml, akan tetapi dikarenakan dalam praktiknya harus dlebihkan maka volume total stok larutan menjadi sebanyak 72 ml. Larutan stok ini digunakan selama 7 hari perlakuan pemberian timbal asetat.

3.6.1.5 Pembuatan Sediaan Larutan Timbal Asetat 0,3 mg/gr Berat Badan

Sediaan larutan timbal asetat 0,3 mg/gr berat badan dibuat dengan mengukur stok timbal asetat sebanyak 0,2 gram pada neraca analitik. Kemudian dilarutkan dengan aquades hingga homogen, setelah itu ditambah aquades hingga mencapai volume 70 ml. Hal ini didasarkan pada pemberian timbal asetat pada mencit adalah sebesar 0,5 ml karena batas maksimum lambung mencit adalah 1 ml sehingga total volume yang dibutuhkan selama 7 hari untuk 5 ekor mencit adalah sebesar 72 ml. Dikarenakan volume larutan yang diperlukan dalam praktik selalu melebihi total larutan stok, maka volume larutan ditambah hingga volume 72 ml.

3.6.1.6 Perhitungan Dosis Estrak Etanol Jintan Hitam (*Nigella sativa*L.)

Berdasarkan jurnal penelitian Kurniaet al., (2011) menyatakan bahwa dosis 2,4g/gr/hari mampu mencegah penurunan rerata kadar MDA mencit. Pada penelitian ini digunakan ekstrak tanaman, yaitu pada jintan hitam (*Nigella sativa*L.)

Penelitian ini menggunakan 3 dosis yang berbeda. Rentang ketiga dosis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

A. Dosis Perlakuan Ekstrak Jintan hitam (*Nigella sativa* L)

- a. Dosis I : 0,6 g/ gr BB per hari
- b. Dosis II : 1,2g/ gr BB per hari
- c. Dosis III : 2,4 g/ gr BB per hari

B. Dosis Perlakuan

Dosis stok = volume sonde (ml)x jumlah mencit (ekor) x lama pemberian (hari) =
15 ml/ hari

Dosis stok = 0,5 x 5 x 15 = 37,5 ml

3.6.1.7 Perhitungan Larutan Stok Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*)

1. Dosis I

$$0,6 \text{ g}/1000\text{g} = 6 \times 10^{-4} \text{ g/g mencit}$$

$$20 \text{ g} = 6 \times 10^{-4} \times 20$$

$$= 120 \times 10^{-4} \text{g}/ 20 \text{ g mencit}$$

$$= 0,012 \text{ g}$$

$$= 12 \text{ mg}$$

$$= 12 \times 5$$

$$= 60 \text{ mg}$$

$$= 60 \text{ mg} \times 17$$

$$= 1020 \text{ mg} = 1,02 \text{ g}$$

Jadi larutan stok yang digunakan adalah 1,02 g diencerkan dengan Na-CMC hingga volumenya 37,5 ml untuk 15 hari.

2. Dosis II

$$1,2 \text{ g}/1000\text{g} = 1,2 \times 10^{-3} \text{ g/g mencit}$$

$$20 \text{ g} = 1,2 \times 10^{-3} \times 20$$

$$= 24 \times 10^{-3} \text{ g} / 20 \text{ g mencit}$$

$$= 0,024 \text{ g}$$

$$= 24 \text{ mg}$$

$$= 24 \times 5$$

$$= 120 \text{ mg}$$

$$= 120 \text{ mg} \times 17$$

$$= 2040 \text{ mg} = 2,04 \text{ g}$$

Jadi larutan stok yang digunakan adalah 2,04 g diencerkan dengan Na-CMC hingga volumenya 37,5 ml untuk 15 hari.

3. Dosis III

$$2,4 \text{ g} / 1000 \text{ g} = 2,4 \times 10^{-3} \text{ g} / \text{g mencit}$$

$$20 \text{ g} = 2,4 \times 10^{-3} \times 20$$

$$= 48 \times 10^{-3} \text{ g} / 20 \text{ g mencit}$$

$$= 0,048 \text{ g}$$

$$= 48 \text{ mg}$$

$$= 48 \times 5$$

$$= 240 \text{ mg}$$

$$= 240 \text{ mg} \times 17$$

$$= 4080 \text{ mg} = 4,08 \text{ g}$$

Jadi larutan stok yang digunakan adalah 4,08 g diencerkan dengan Na-CMC hingga volumenya 37,5 ml untuk 15 hari.

3.6.2 Tahap Pelaksanaan

3.6.2.1 Perlakuan Pada Hewan Coba

1. Kelompok K⁻: Kelompok kontrol negatif sebanyak 5 ekor mencit tanpa dipapar timbal (Pb) Asetat dan tanpa diberi ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*).
2. Kelompok K⁺: Kelompok kontrol positif sebanyak 5 ekor mencit yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB dan tanpa diberi ekstrak etanol daun jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 0 mg/gr BB per hari.
3. Kelompok D1: Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB dan diberi ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 0,6 mg/gr BB per hari.
4. Kelompok D2: Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB dan diberi ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 1,2 mg/gr BB per hari.
5. Kelompok D3: Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB dan diberi ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 2,4 mg/gr BB per hari.

3.6.2.2 Perlakuan Pemaparan Timbal (Pb) Asetat

Pemaparan timbal (Pb) Asetat yang dilakukan dengan cara diberikan secara oral dengan menggunakan sonde lambung atau spuit yang dimodifikasi, yang diberikan sekitar pukul 09.00 WIB pagi dalam jangka waktu selama 7 hari pada masing-masing perlakuan.

3.6.2.3 Perlakuan Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*)

Pemaparan ekstrak etanol Jintan Hitam (*Nigella sativa*) yang dilakukan dengan cara oral menggunakan sonde lambung atau spuit yang dimodifikasi, yang diberikan sekitar pukul 08.00 WIB pagi dalam jangka waktu 15 hari setelah hari ke-16 aklimatisasi (atau hari ke-8 setelah pemeparan timbal asetat) pada masing-masing mencit perlakuan kecuali pada kelompok kontrol dan kontrol negatif (kelompok yang hanya diberi ekstrak timbal asetat saja).

3.6.3 Tahap Pengambilan Data

3.6.3.1 Tahap Pemeriksaan Integritas Membran Spermatozoa

Dalam jurnal Hayati *et al.*, (2006) dijelaskan setelah perlakuan berakhir hewan coba dieutanasi dengan kloroform, kemudian dilakukan nekropsi, spermstozoa diambil dari kauda epididimis dan vas deferen. Koleksi spermatozoa dengan cara modifikasi yang pada garis besarnya seperti berikut. Epididimis bagian kauda dan vas deferen dari masing-masing kelompok dipisahkan dari testisnya, kemudian diletakkann ke dalam cawan petri yang berisi 4 m larutan fisiologis. Spermatozoa dikoleksi dengan cara flusing dengn menggunakan mikroskop stereo, jarum suntik yang mengandung 1 ml larutan fisiologis dimasukkan ke lubang vas deferen. Selanjutnya jarum ditekan pelan sehingga larutan fisiologis dapat mendorong spermatozoa yang ada di vas deferen dan epididimis, suspensi spermatozoa siap intuk diperiksa kadar MDA sperma dan integritas spermatozoa.

Pengamatan integritas membran spermatozoa dilakukan dengan uji HOS tes. Suspensi sperma 0,5 ml ditambahkan 4,5 ml larutan pembengkak (0,735 gram *sodium citrat dihydrate* ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dan 1,351 gram fruktosa dalam 100 ml

air destilasi) dicampur dengan hati-hati menggunakan pipet, kemudian diinkubasi didalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah diinkubasi larutan tersebut diambil satu tetes dan diletakkan pada gelas objek selanjutnya ditambahkan satu tetes larutan eosin 1% dan negrosin 10%. Kemudian dibuat preparat ulas dan diamatai 400x. Integritas membran spermatozoa yang menggebung setiap 100 spermatozoa (%) (WHO,1999).

3.6.3.2 Perhitungan Kadar MDA Epididimis Mencit

Menghitung kadar MDA dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV dengan panjang gelombang 534 nm. Sementara itu prosedur yang dilakukan untuk menentukan kadar MDA epididimis pada mencit sebagai berikut (Fauzi, 2008) :

1. TBA/ *buffer reagent* dilarutkan dengan 100 mL aquadest, selanjutnya ditambah 0,5 *sodium hidroxyde* dan 100 mL asam asetat glasial
2. Sebanyak 500 µl sampel (standart MDA untuk spektrofotometer) dimasukkan dalam tabung endorff yang masing-masing telah diberi label
3. Ditambah 0,5 mL aquadest pada masing-masing tabung
4. Ditambahkan 0,5 mL TBA/*buffer reagent*
5. Selanjutnya pada masing-masing tabung diinkubasi di dalam waterbath dengan suhu 95⁰ C selama 60 menit
6. Setelah diinkubasi, masing-masing tabung dikeluarkan dari waterbath dan setelah dingin masing-masing tabung disentrifugasi dengan kecepatan 7000rpm selama 10 menit
7. Supernatan diambil untuk selanjutnya dianalisis dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 534 nm.

3.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan dianalisis dengan menggunakan uji statistik ANOVA tunggal karena hanya menggunakan satu faktorial. Bila terdapat perbedaan sangat nyata dilanjutkan dengan uji lanjut menggunakan BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan signifikan 1% untuk melihat perbedaan sangat nyata antara kelompok kontrol dengan masing-masing perlakuan.

