

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Kandang B Jurusan Peternakan Universitas Lampung dan Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional III Bandar Lampung. Penelitian ini dilakukan pada 16 April 2011--26 Juli 2011.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa brusein A yang dikapsulasi liposom, *egg yolk phosphatidylcholine*, *cholesterol*, *diacetylphosphat*, *phosphate buffered saline*, EtOAc, MeOH, CHCl₃, *hexana*, EtOH, ayam jantan tipe medium umur 5 minggu dalam keadaan sehat dan bahan-bahan lain untuk analisis.

Peralatan yang digunakan adalah kandang *battery*, *bell drinker*, *hanging feeder*, jarum suntik, tabung plastik, kertas label, pisau *stanless*, pisau konvensional yang memerlukan pengasahan, pisau *disposable*, pengasah manual, pengasah otomatis, mikrotom putar, dan mikrotom geser.

C. Metode Penelitian

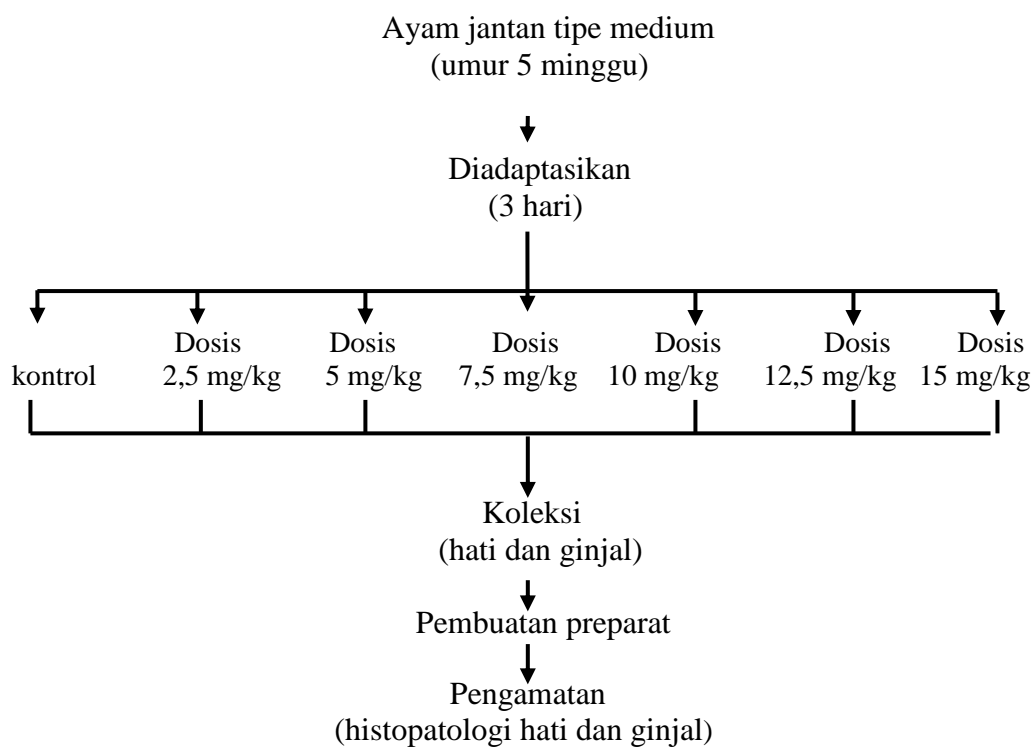
Penelitian disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan dosis brusein-A dengan 3 kali ulangan. Perlakuan yang diberikan terdiri dari 7 taraf yaitu; 0 mg/kg BB (A2); 2,5 mg/kg BB (A2); 5,0 mg/kg BB (A3); 7,5 mg/kg BB (A4); 10,0 mg/kg BB (A5); 12,5 mg/kg BB (A6); dan 15,0 mg/kg BB (A7).

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan gambar, kemudian dianalisis secara deskriptif.

D. Pelaksanaan Penelitian

Brusein-A yang dikapsulasi liposom akan diuji tingkat toksisitasnya pada ayam percobaan. Ayam jantan tipe medium umur lima minggu serta bebas infeksi penyakit digunakan dalam percobaan ini. Ayam jantan tipe medium diadaptasikan dalam kandang selama tiga hari. Ayam kemudian dikelompokkan menjadi tujuh kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari tiga ekor yang ditempatkan dalam kandang terpisah. Masing-masing kelompok ayam jantan tipe medium selama tujuh hari berturut turut diberikan brusein-A yang dikapsulasi liposom secara oral dengan dosis 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; dan 15,0 mg/kg BB.

Pengamatan terhadap kerusakan hati dan ginjal ayam dilakukan pada hari ke delapan. Diagram alir pelaksanaan penelitian dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Diagram alir penelitian

E. Pembuatan Preparat Hati dan Ginjal

Prosedur pembuatan preparat hati dan ginjal sesuai dengan prosedur Robbinson (1995), adalah sebagai berikut:

1. Fiksasi

Tahapan fiksasi yaitu dengan cara merendam hati dan ginjal menggunakan larutan formalin (formaldehida) 10% yang telah disiapkan sebelumnya.

2. *Trimming*

Trimming adalah tahapan yang dilakukan setelah proses fiksasi dengan melakukan pemotongan tipis jaringan setebal kurang lebih 4 mm dengan orientasi sesuai organ yang akan dipotong. Pisau yang digunakan untuk

trimming adalah pisau scalpel No 22--24. Jumlah potongan jaringan yang akan dimuat dalam *embedding cassette* berkisar antara 1--5 buah disesuaikan dengan ukuran organ.

3. Dehidrasi

Dehidrasi jaringan yang dilakukan setelah *trimming* menggunakan *tissue processor*, dimaksudkan untuk mengeluarkan air yang terkandung dalam jaringan dengan menggunakan cairan dehidran seperti *ethanol* atau *iso propyl alcohol*. Cairan dehidran ini kemudian dibersihkan dari dalam jaringan dengan menggunakan reagen pembersih (*clearing agent*) seperti xylene atau toluene. Reagen pembersih ini diganti dengan *paraffin* dengan cara penetrasi ke dalam jaringan. *Paraffin* yang digunakan adalah yang mempunyai titik cair 56--58⁰C. cairan dalam *tissue processor* diganti setiap 1--2 minggu sekali.

4. *Embedding*

Setelah melalui proses dehidrasi, maka jaringan yang berada dalam *embedding cassette* dipindahkan ke dalam *base mold*, kemudian diisi dengan paraffin cair, kemudian dilekatkan pada balok kayu ukuran 3 x 3 cm atau pada *embedding cassette*. Jaringan yang sudah dilekatkan pada balok kayu atau *cassette* disebut blok. Fungsi dari balok kayu atau *cassette* adalah untuk pemegang pada saat blok dipotong pada mikrotom.

5. *Cutting*

Cutting adalah pemotongan jaringan yang sudah didehidrasi dengan menggunakan mikrotom. Dengan menggunakan pisau yang tajam sehingga menghasilkan preparat, yang secara mikroskopis ditandai dengan tidak adanya artefak berupa goresan vertikal maupun horizontal.

Pelaksanaan *cutting* adalah sebagai berikut:

- a) Orientasi blok pada mikrotom
 - 1) Meletakkan blok sejajar memanjang dengan pisau.
 - 2) Meletakkan jaringan yang keras di bagian atas.
 - 3) Menyediakan cukup ruangan antara jaringan dengan tepi blok untuk memudahkan pemisahan jaringan.
 - 4) Hasil pemotongan yang rata dan tidak berkerut menandakan ketajaman pisau yang digunakan.
- b) *Soaking* dan *Icing*
 - 1) Melembabkan jaringan dengan cara menempelkan kapas basah pada permukaan blok.
 - 2) Untuk menjaga agar suhu blok dan suhu pisau tetap sama, masing-masing didinginkan dengan air es.
- c) Mengembangkan lembaran potongan jaringan
 - 1) Lembaran potongan jaringan diapungkan dengan meletakkan salah satu ujung potongan diatas permukaan air dalam waterbath.
 - 2) Menghilangkan kerutan jaringan dengan cara menekan salah satu sisi dari potongan jaringan dengan ujung jari dan sisi lain ditarik dengan menggunakan kuas kecil.
- d) Memisahkan rangkaian lembaran jaringan

Dengan menggunakan pemisah jaringan yang dipanaskan dilakukan pemisahan rangkaian lembaran jaringan (*ribbon*).
- e) Pengambilan *ribbon* dengan slide.

- 1) Mengambil lembaran jaringan dengan cara memasukan slide bersih secara diagonal ke dalam waterbath (gerakan menyendok). Spesimen jaringan diletakan tepat ditengah slide.
- 2) Mencegah jangan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan.

6. *Staining* (pewarnaan)

Menggunakan teknik pewarnaan H dan E (Harris hapmatoxyline. Eusin).

7. *Mounting*

Setelah jaringan pada slide diwarnai, melakukan mounting dengan cara meneteskan bahan mounting (DPX, Entelan, Canada balsam) sesuai kebutuhan dan ditutup dengan coverglass, agar jangan sampai terbentuk gelembung udara.

F. Pengamatan Preparat Histopatologi Sel Hati dan Ginjal

Pengamatan histopatologi dilakukan dengan membuat preparat organ hati dan ginjal. Pembuatan preparat organ hati dan ginjal sesuai dengan prosedur Robbinson (1995). Pengamatan histopatologi dilakukan dengan mikroskop cahaya dan video mikrometer dengan pembesaran 400 kali. Perubahan sel (lesio) pada 21 lapang pandang organ ginjal dan hati dicatat dan selanjutnya diinterpretasikan.