

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Zoologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Biologi Universitas Lampung untuk pemeliharaan dan pemberian perlakuan pada mencit, sedangkan pembuatan preparat histologis ginjal dilaksanakan di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung. Penelitian ini dilaksanakan mulai April sampai Mei 2013.

B. Alat dan Bahan

1. Hewan Percobaan

Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus* L.) jantan yang berasal dari BPPV Regional III sebanyak 30 ekor. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini memiliki berat rata-rata sekitar 30-35 gram. Sebelum diberi perlakuan, dilakukan aklimatisasi terlebih dahulu kepada mencit selama kurang lebih 1 minggu. Aklimatisasi ini dilakukan dengan tujuan agar mencit terbiasa dengan tempat tinggal yang baru dan tidak stress.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit yang berbentuk persegi dengan ukuran 15x15 cm. Kandang mencit yang digunakan sebanyak 20 kandang dengan penutupnya menggunakan bahan kawat. SLM (*Sound Level Meter*) yang digunakan untuk mengukur intensitas bunyi dan sterofom digunakan sebagai alat peredam suara. Alat lainnya yang digunakan adalah timbangan mencit, kotak mencit, botol minum mencit, gelas kimia, papan fiksasi, kaca penutup (*cover glass*), stopwatch, dan mikroskop cahaya.

3. Bahan

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu organ ginjal mencit jantan, *aluminium foil*, xylol, paraffin, aquades, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 96%, alkohol absolut, eosin, pewarna *Harris*, larutan PBS (Phosphat Buffer Saline) dengan pH 6,8 dan kloroform.

C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dibedakan menjadi dua, yaitu variabel bebas (*independent variable*) dan variabel terikat (*dependent variable*). Variabel bebas mencakup perlakuan, paparan yang diberikan sebagai perlakuan terhadap mencit adalah sebagai berikut mencit ditempatkan pada ruangan yang akan diberi paparan suara kebisingan yang berjarak 1 meter dari tempat mencit berada. Dan dua puluh lima ekor mencit jantan dewasa dibagi mejadi 5

kelompok dengan masing-masing kelompok tersebut terdiri dari 5 ekor mencit jantan dewasa. Dengan Kelompok kontrol (P0), Kelompok paparan I (P1) 6 jam/hari, Kelompok paparan II (P2) 8 jam/hari, Kelompok paparan III (P3) 10 jam/hari, dan Kelompok paparan IV (P4) 12 jam/hari. Kelompok ini diberi kebisingan 85-90 dB dengan intensitas paparan sebesar 12 jam per hari selama 21 hari. Variabel terikat mencakup kerusakan berupa perdarahan, nekrosis, piknosis, kariolisis, dan kongesti.

2. Definisi Oprasional

- Nekrosis, yaitu terjadi setelah suplai darah hilang atau setelah terpajan toksin dan ditandai dengan pembengkakan sel, denaturasi protein, serta kerusakan organel sel.
- Piknosis yaitu, ditandai dengan melisutnya inti sel dan peningkatan basofil kemudian DNA berkondensasi menjadi massa yang melisut padat.
- Kariolisis yaitu, basofilia kromatin memudar yang disebabkan oleh aktivitas DNA (*Deoxyribo Nucleid Acid*) (Mitchell dan Cotran, 2007).
- Kongesti yaitu, suatu keadaan yang disertai meningkatnya volume darah dalam pembuluh darah yang melebar pada suatu alat atau bagian tubuh (Saleh,1979)
- Perdarahan yaitu, keluarnya darah dari sistem kardiovaskuler, disertai penimbunan dalam jaringan atau ruang tubuh atau disertai keluarnya darah dari tubuh.

D. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 1 kelompok kontrol, 4 kelompok diberi paparan kebisingan yang sama dengan perbedaan waktu paparan.

Paparan yang diberikan sebagai perlakuan terhadap mencit adalah sebagai berikut:

1. Mencit ditempatkan pada ruangan yang akan diberi paparan suara kebisingan yang berjarak 1 meter dari tempat mencit berada.
2. 25 ekor mencit jantan dewasa dibagi menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok tersebut terdiri dari 5 ekor mencit jantan dewasa.

Berikut adalah uraian dari masing-masing kelompok :

Kelompok kontrol (P0) : kelompok kontrol ini tidak diberi perlakuan paparan kebisingan karena sebagai pembanding yang normal terhadap kelompok mencit yang diberikan perlakuan pajanan kebisingan.

- a. Kelompok paparan I (P1): kelompok ini diberi paparan kebisingan 85-90 dB dengan intensitas paparan sebesar 6 jam per hari selama 21 hari.
- b. Kelompok paparan II (P2): kelompok ini diberi paparan kebisingan 85-90 dB dengan intensitas paparan sebesar 8 jam per hari selama 21 hari.
- c. Kelompok paparan III (P3): kelompok ini diberi paparan kebisingan 85-90 dB dengan intensitas paparan sebesar 10 jam per hari selama 21 hari.

- d. Kelompok paparan IV (P4): kelompok ini diberi paparan kebisingan 85-90 dB dengan intensitas paparan sebesar 12 jam per hari selama 21 hari.

Adapun desain penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Desain Penelitian

E. Pelaksanaan Penelitian

1. Hewan Percobaan Mencit (*Mus musculus* L.)

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung dengan menggunakan 30 ekor mencit jantan. Mencit ditempatkan di dalam kandang yang diberi sekat menjadi lima bagian. Mencit yang digunakan rata-rata mempunyai berat sekitar 30-35 gram dengan usia 3-4 bulan, diperoleh dari Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BVPP) Regional III Bandar Lampung. Selama pemeliharaan, mencit diberi makan pellet komersial mencit atau hewan pengerat (makanan asupan sekitar 15g/100g BB / hari, asupan air sekitar 15 ml/100g BB / hari) dan ditempatkan

dalam lingkungan yang terkontrol (24 jam siklus gelap suhu kamar dipertahankan pada $27 \pm 2^\circ \text{C}$, dengan kelembaban relatif pada $55 \pm 10\%$) (Fidan, Enginar, Cigerci, Korcan, Ozdemir, 2008).

2. Proses Pembedahan Mencit (*Mus musculus* L.)

Setelah mencit diberi perlakuan selama 21 hari, maka pada hari yang ke-22 dilakukan pembedahan untuk diambil organ ginjalnya. Pembedahan ini dilakukan dengan cara pembiusan mencit menggunakan kloroform, setelah mencit pingsan, dilakukan pembedahan pada bagian ventral tubuh mencit secara vertikal, lalu diambil organ ginjalnya. Ginjal yang telah diambil segera difiksasi menggunakan larutan formalin 10% di dalam botol. Perbandingan volume spesimen dengan larutan formalin 1:10 untuk mendapatkan hasil yang sempurna. Kemudian organ ginjal tersebut dibawa ke laboratorium Patologi, Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung, untuk seterusnya organ ginjal tersebut dibuat preparat histologis.

3. Pembuatan Preparat Histologis Ginjal Mencit Jantan (*Mus musculus* L.)

Pembuatan preparat histologis ginjal mencit ini dilakukan di Laboratorium Patologi, Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III. Adapun cara yang dilakukan dalam pembuatan preparat sebagai berikut:

a. Fiksasi

Fiksasi adalah suatu proses yang dilakukan untuk sel atau jaringan agar tetap dalam posisinya dan tidak berubah baik bentuk ataupun ukurannya. Spesimen hasil nekropsis yang berupa organ ginjal yang berasal dari

kelompok kontrol dan kelompok hewan yang diberi perlakuan paparan kebisingan dimasukkan ke dalam larutan fiksasi (pengawet), *buffer formalin* 1:10.

b. Trimming

Trimming adalah suatu pencucian untuk menghilangkan larutan fiksasi, dimana *Buffer formalin* 10% dihilangkan dengan menggunakan air mengalir selama 30 menit.

c. Dehidrasi

Dehidrasi adalah proses yang dilakukan setelah proses trimming. Proses ini bertujuan untuk mengeluarkan air yang terkandung di dalam jaringan. Organ diletakkan di atas tisu untuk mengeringkan air. Proses ini dilakukan menggunakan alat *Embedding cassette*. Proses selanjutnya adalah organ tersebut diberi perlakuan sebagai berikut secara berurutan :

Tabel 2. Tahapan Proses Dehidrasi:

Tahap	Waktu	Zat Kimia
Dehidrasi	2 jam	Alkohol 80%
	2 jam	Alkohol 95%
	2 jam	Alkohol 95%
Clearing	1 jam	Alkoholabsolut I
	1 jam	Alkoholabsolut II
	1 jam	Alkoholabsolut III
	1 jam	Xylol I
	1 jam	Xylol II
	1 jam	Xylol III
	1 jam	Xylol III
Impregnasi	2 jam	Parafin I
	2 jam	Parafin II
	2 jam	Parafin III

d. Embedding

Proses penanaman jaringan ke dalam media parafin. Tujuannya adalah untuk mempermudah dalam melakukan proses pemotongan atau pengirisan sampel. Dilakukan dengan mengeluarkan jaringan yang sudah diimpregnasi dari *moldtray*, kemudian menanamnya ke dalam lempengan blok yang berisi parafin cair. Setelah itu tutup dengan menggunakan *casette and deckel* lalu didinginkan pada *cold plate*.

e. Cutting

Proses pemotongan atau pengirisan jaringan dengan menggunakan mikrotom. Sampel yang dipotong tebalnya sekitar 4-5 mikron. Pemotongan akan berhasil jika pisau tidak tumpul, tidak berkarat, dan tidak terdapat sisa-sisa parafin dari hasil pemotongan sebelumnya dan posisi sampel lurus dan baik. Suhu pisau dan suhu sampel serta suhu ruangan harus sama agar sampel tidak patah atau terpotong-potong saat pengirisan.

f. Staining/Pewarnaan

Setelah pembuatan preparat selesai, dilakukan pewarnaan dengan menggunakan pewarna *Hematoxylin Eosin*. Zat kimia yang digunakan dalam pewarnaan ini adalah sebagai berikut:

1. Hematoxylin Kristal : 5 g
2. Alkohol absolut : 50 g
3. Ammonium : 100g/L
4. Aquadest : 100 mL
5. *Mercury oxide* : 2,5 g

g. Mounting

Setelah pewarnaan slide selesai, slide ditempelkan di atas kertas tisu pada tempat yang datar dan selanjutnya ditetesi dengan menggunakan *Canada Balsam* dan ditutup dengan menggunakan *cover glass* dan dicegah jangan sampai ada gelembung udara.

h. Pengamatan

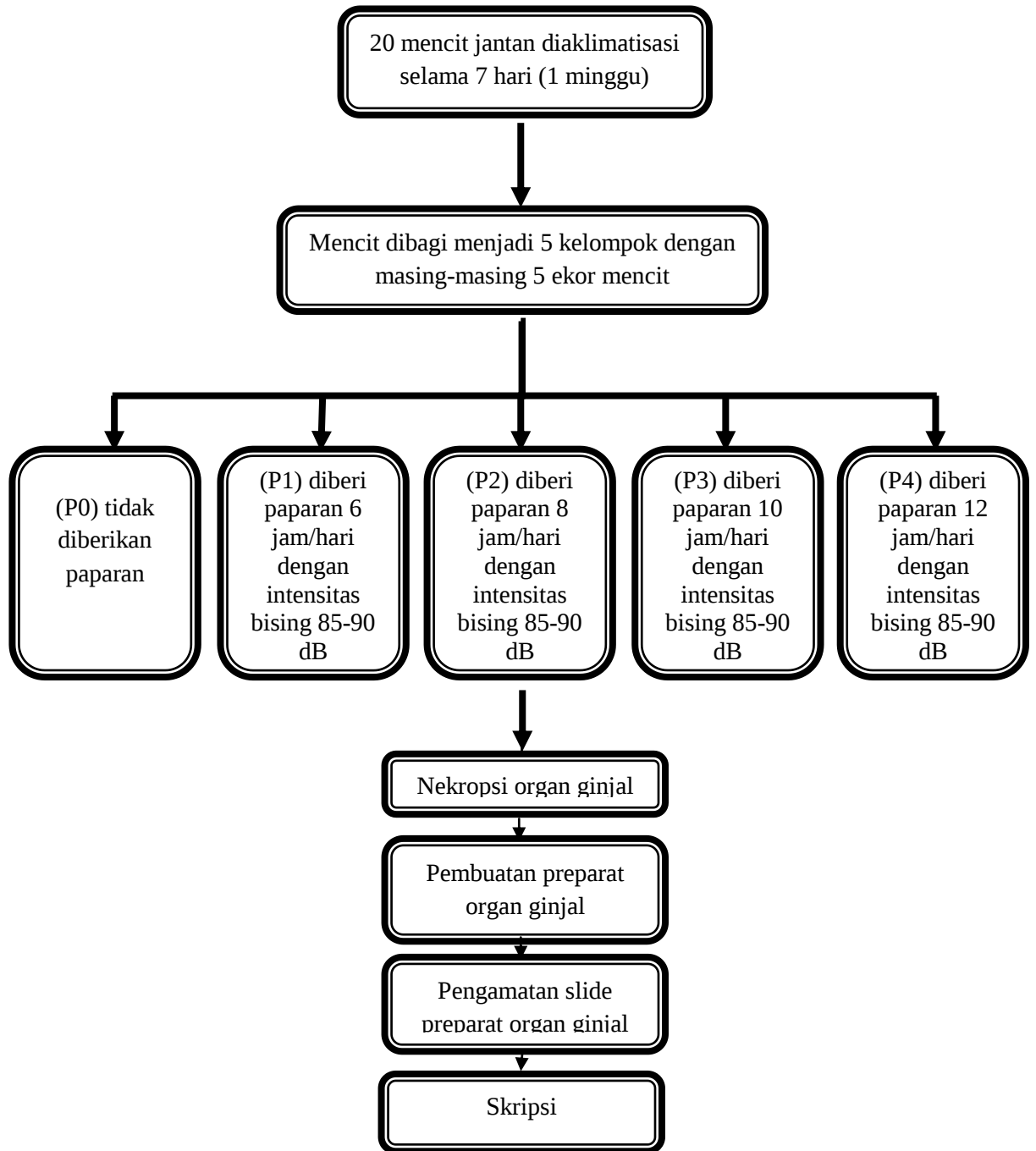
Preparat yang telah jadi diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x, 200x, 400x.

i. Pengolahan data

Pengolahan data dilakukan secara deskriptif dengan menyajikan hasil penelitian berupa presentasi kerusakan dan gambar-gambar tubulus proksimal ginjal mencit jantan antar perlakuan.

F. Parameter yang Diamati

Pada penelitian ini parameter yang diamati, yaitu derajat kerusakan struktur histologis tubulus proksimal ginjal.

G. Diagram Alir Penelitian

Gambar 5. Diagram Alir Penelitian