

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Zoologi Biologi FMIPA Universitas Lampung untuk pemeliharaan dan pemberian perlakuan pada mencit dan pembuatan preparat histologis testis dilaksanakan di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan April 2013 sampai dengan Mei 2013.

B. Alat dan Bahan

1. Hewan Percobaan

Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus* L.) jantan yang berasal dari BPPV Regional III Bandar Lampung sebanyak 25 ekor. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini memiliki berat rata-rata sekitar 30-35 gram berumur \pm 3 bulan.

Sebelum diberi perlakuan, mencit diaklimatisasi terlebih dahulu 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 berukuran 15x15 cm dengan penutup kawat sebanyak 20 kandang. Sumber kebisingan berasal dari *software soundcard scope*. SLM (*Sound Level Meter*) digunakan untuk mengukur intensitas bunyi dan steroform digunakan sebagai alat peredam suara. Alat lainnya yang digunakan adalah gelas kimia, timbangan mencit, kotak mencit, papan fiksasi, botol minum mencit, kaca penutup (*cover glass*), stopwatch, mikroskop cahaya dan seperangkat alat untuk pembuatan preparat histologis testis.

3. Bahan

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

C. Pelaksanaan Penelitian

1. Pemberian perlakuan

Paparan yang diberikan sebagai perlakuan terhadap mencit adalah sebagai berikut:

1. Kebisingan yang diberikan sebagai perlakuan terhadap mencit bersumber dari *software soundcard scope* yang diberi tambahan penguat suara dengan intensitas kebisingan 85-90 dBA.
2. Mencit ditempatkan pada ruangan yang diberi paparan suara kebisingan dengan jarak 1 meter dari tempat mencit berada.
3. 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 :

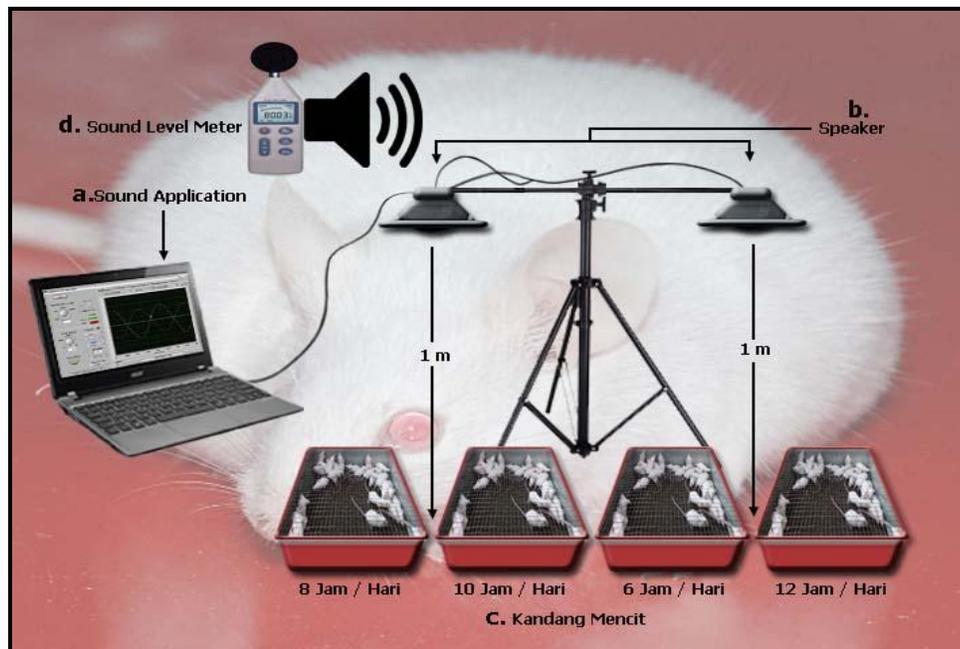
- a. Kelompok kontrol (K) : kelompok kontrol ini tidak diberi perlakuan karena sebagai pembanding yang normal terhadap kelompok mencit yang diberi perlakuan paparan kebisingan.
- b. Kelompok paparan I (P1): kelompok ini diberi paparan kebisingan 85-90 dB dengan intensitas paparan sebesar 6 jam per hari selama 21 hari.
- c. Kelompok paparan II (P2): kelompok ini diberi paparan kebisingan 85-90 dB dengan intensitas paparan sebesar 8 jam per hari selama 21 hari.

- d. Kelompok paparan III (P3): kelompok ini diberi paparan kebisingan 85-90 dB dengan intensitas paparan sebesar 10 jam per hari selama 21 hari.
- e. Kelompok paparan IV (P4): kelompok ini diberi paparan kebisingan 85-90 dB dengan intensitas paparan sebesar 12 jam per hari selama 21 hari.

(Keputusan Menteri Tenaga Kerja No.51 tentang Nilai Ambang Batas Kebisingan,1999).

2. Sketsa penelitian

Sketsa penelitian disusun dengan merangkaikan 4 alat yaitu laptop yang telah terhubung dengan *sound applications (soundcard scope)*. *Soundcard scope* ini berfungsi sebagai sumber suara yang kemudian dihubungkan dengan pengeras suara (*speaker*). Suara yang dikeluarkan dari *speaker* akan diukur menggunakan alat SLM (*Sound Level Meter*) dengan intensitas kebisingan sebesar 85-90 dBA. *Speaker* inilah yang akan secara langsung memberikan paparan kebisingan terhadap mencit yang berada di bawahnya. Jumlah kandang mencit yang digunakan ada 4 yaitu kandang mencit dengan label pemaparan kebisingan selama 6 jam/hari, 8 jam/hari, 10 jam/hari, dan 12 jam/hari. Gambar desain penelitian dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Sketsa penelitian paparan kebisingan

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

Setelah mencit diberi perlakuan selama 21 hari, maka pada hari yang ke-22 dilakukan pembedahan untuk mengambil organ testis dari mencit tersebut. Sebelum dibedah, mencit dibius dengan kloroform, selanjutnya mencit dibedah mulai di bagian ventral tubuh secara vertikal, lalu diambil testisnya. Testis yang telah diambil segera ditimbang dengan timbangan analitik dan difiksasi menggunakan larutan formalin 10% di dalam botol. Perbandingan volume spesimen dengan larutan formalin 1:10 untuk mendapatkan hasil yang sempurna.

Kemudian organ testis tersebut dibawa ke laboratorium Patologi, Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung, untuk seterusnya dibuat preparat histologisnya.

4. Pembuatan Preparat Histologis Testis Mencit (*Mus musculus L.*)

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

a. Trimming

Trimming adalah suatu proses tahapan yang dilakukan setelah proses fiksasi, dimana *buffer formalin* 10% dihilangkan menggunakan air mengalir selama 30 menit. Berikut ini adalah proses tahapan *trimming* :

1. Spesimen berupa potongan organ atau jaringan tubuh yang telah dipilih segera difiksasi dengan larutan pengawet berupa buffer formalin atau 10% formalin.
2. Organ tersebut dicuci dengan air mengalir.
3. Jaringan dipotong setebal 2-4 mm.
4. Potongan-potongan jaringan dimasukkan ke dalam *embedding cassette*.
Dalam satu *embedding cassette* dapat diisi 1-5 buah potongan jaringan yang disesuaikan dengan ukuran besar kecilnya potongan.
5. Potongan jaringan tersebut dicuci dengan air mengalir.

b. Dehidrasi

Dehidrasi adalah proses penarikan molekul air dari dalam jaringan. Tujuan dari dehidrasi adalah agar seluruh ruang-ruang antar sel dalam jaringan dapat diisi dengan molekul parafin. Berikut ini adalah proses tahapan dehidrasi :

1. Air dituntaskan dengan meletakkan *embedding cassette* pada kertas tisu.
2. Berturut-turut dilakukan perlakuan sebagai berikut :

Tabel 3. Tahapan proses dehidrasi

Tahap	Waktu	Zat kimia
Dehidration	2 jam	Alkohol 80 %
	2 jam	Alkohol 95 %
	1 jam	Alkohol 95 %
	1 jam	Alkohol absolut I
	1 jam	Alkohol absolut II
	1 jam	Alkohol absolut III
Clearing	1 jam	Xylol I
	1 jam	Xylol II
	1 jam	Xylol III
Impregnasi	2 jam	Paraffin I
	2 jam	Paraffin II
	2 jam	Paraffin III

c. Embedding

Adapun proses tahapan embedding adalah sebagai berikut :

1. Sisa-sisa parafin pada *pan* dibersihkan dengan memanaskan beberapa saat di atas api kemudian diusap dengan kapas.
2. Parafin cair dimasukkan ke dalam cangkir logam dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu di atas 58 °C.
3. Parafin cair dituangkan ke dalam *pan*.
4. Jaringan dipindahkan satu persatu dari *embedding cassette* ke dasar *pan* dengan mengatur jarak satu dengan lainnya.
5. *Pan* dimasukkan ke dalam air.
6. Parafin yang berisi jaringan tersebut dilepaskan dari *pan* dengan memasukkan ke dalam oven dengan suhu 4-6 °C beberapa saat.
7. Parafin dipotong sesuai dengan letak jaringan yang ada menggunakan skalpel atau pisau hangat.
8. Potongan parafin diletakkan pada balok kayu, pinggirnya diratakan dan ujungnya dibuat sedikit meruncing.
9. Blok parafin siap dipotong dengan mikrotom.

d. Cutting

Cutting adalah proses pemotongan atau pengirisan jaringan dengan menggunakan mikrotom yang dilakukan di ruangan dingin.

Berikut ini adalah proses tahapan *cutting* :

1. Sebelum jaringan dipotong, blok terlebih dahulu didinginkan.
2. Dilakukan pemotongan kasar dan dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron.
3. Setelah pemotongan dipilih lembaran jaringan yang paling baik, diapungkan pada air dan dihilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik dengan menggunakan kuas runcing.
4. Lembaran jaringan tersebut dipindahkan ke dalam *water bath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
5. Dengan gerakan menyendok, lembaran jaringan diambil dengan slide bersih dan ditempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah, dicegah jangan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan.
6. Slide yang berisi jaringan ditempatkan pada inkubator (suhu 37 °C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

e. Staining

Setelah jaringan melekat sempurna, dilakukan pewarnaan dengan menggunakan pewarna *Hematoxylin Eosin* (HE). Slide yang dipilih adalah yang terbaik, selanjutnya secara berurutan dimasukkan ke dalam zat kimia sebagaimana tersaji pada Tabel 4.

Tabel 4. Tahapan proses *staining*

Zat kimia	Waktu
Xylol I	5 menit
Xylol II	5 menit
Xylol III	5 menit
Alkohol absolut I	5 menit
Alkohol absolut II	5 menit
Aquadest	1 menit
Harris Hematoxylin	20 menit
Aquadest	1 menit
Acid Alkohol	2-3 celupan
Aquadest	1 menit
Aquadest	15 menit
Eosin	2 menit
Alkohol 96 % I	2 menit
Alkohol 96 % II	3 menit
Alkohol absolut III	3 menit
Alkohol absolut IV	3 menit
Xylol IV	5 menit
Xylol V	5 menit

Zat kimia yang digunakan dalam pewarnaan ini adalah sebagai berikut:

1. Hematoxylin Kristal : 5 g
2. Alkohol absolute : 50 ml
3. Ammonium : 100g/L
4. Aquadest : 1000 mL
5. *Mercury oxide* : 2,5 g

f. Mounting

Setelah pewarnaan slide selesai, slide ditempelkan di atas kertas tisu pada tempat yang datar, selanjutnya ditetesi *Canada Balsam* dan ditutup dengan *cover glass*. Hal yang harus dihindari adalah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

g. Pengamatan/Pembacaan slide

Preparat yang telah jadi, diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali, 200 kali, dan 400 kali. Kemudian diamati perubahan yang terjadi.

D. Parameter yang Diamati

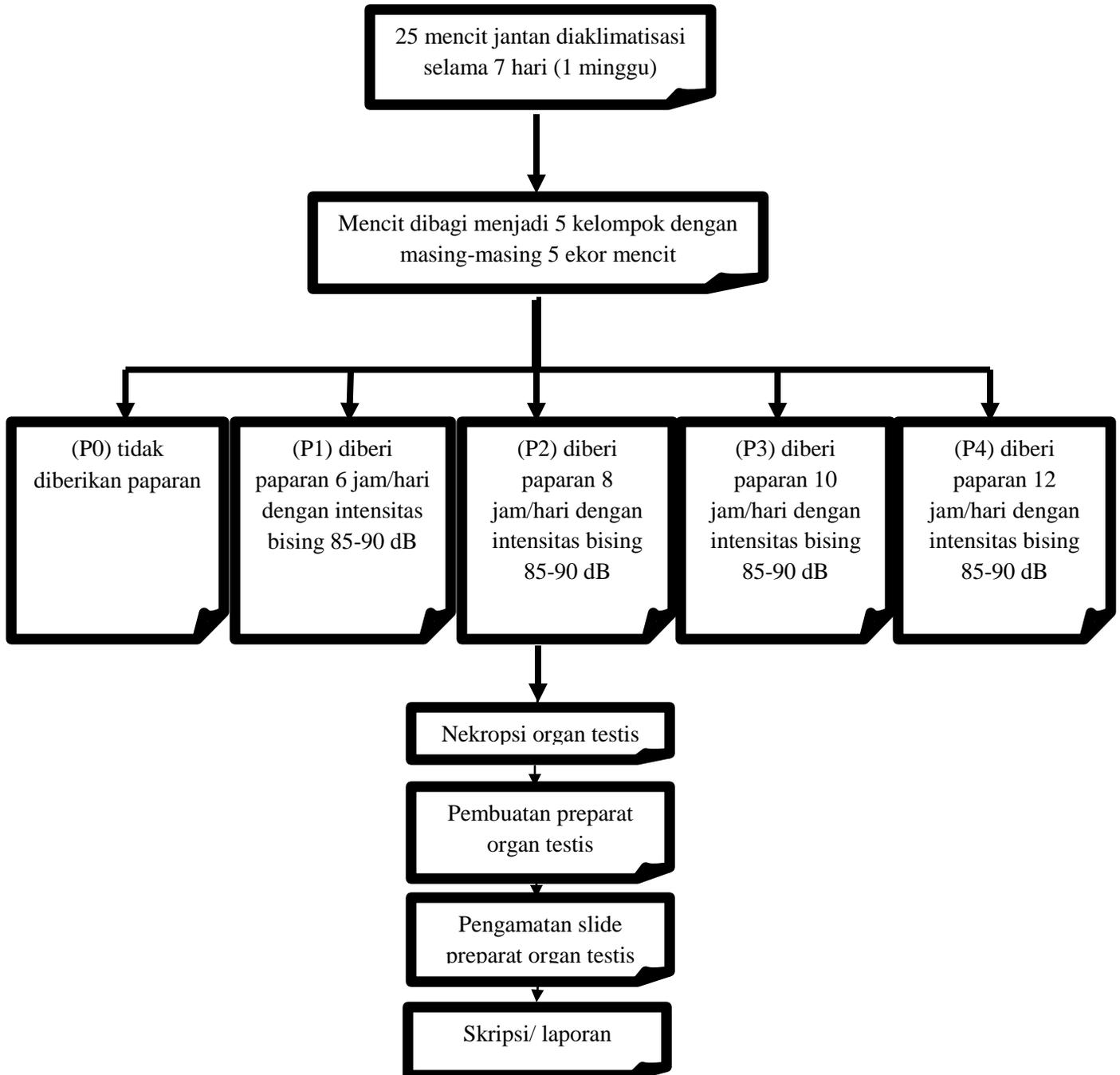
Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Berat testis
2. Derajat kerusakan struktur histologis testis mencit.

E. Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terbagi atas 5 kelompok perlakuan. Masing-masing perlakuan dan kontrol memiliki ulangan 5 ekor mencit. Data berat organ testis yang diperoleh akan diolah secara kuantitatif. Data dianalisis dengan Analisis Ragam (ANARA) untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan perlakuan. Apabila ada perbedaan yang nyata maka akan dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5 % untuk perbandingan dari masing-masing kelompok. Hasil pemeriksaan struktur histologis sel-sel tubulus seminiferus akan dianalisa secara deskriptif.

F. Diagram Alir Penelitian



Gambar 6. Diagram Alir Penelitian