

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Zoologi Biologi FMIPA Universitas Lampung dan pembuatan preparat histologi ginjal dilaksanakan di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) regional III. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan Oktober 2009.

B. Alat dan Bahan Penelitian

1. Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah 20 ekor mencit jantan (*Mus musculus* L.) yang berumur 4 bulan yang diperoleh dari Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) regional III, Bandar Lampung. Sebelum diberi perlakuan semua hewan percobaan diaklimatisasi selama dua minggu serta diberi pakan dan minuman secara *ad libitum*.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Kandang hewan uji (mencit) terbuat dari kawat berukuran 15 x 20 cm yang berjumlah 20 kandang dimana terdapat tempat minum dan makan yang terbuat dari

aluminium, lempeng logam elektroda berukuran 15 x 8 cm yang berfungsi sebagai media pajanan medan listrik, *electric power supply* untuk mengalirkan medan listrik, kamera untuk dokumentasi, alat bedah (gunting, pinset, dan pisau bedah), digunakan untuk membedah mencit, botol specimen untuk menyimpan organ ginjal, mikrotom geser, *Embedding cassette*, digunakan dalam proses dehidrasi, alat-alat untuk membantu proses *embedding* (*pan*, lampu gas, oven, kuas, dan gunting tulang, balok kayu (3 x 2 cm)), mikrotom geser untuk membuat sayatan mikroskopis, *Staining jar*, *Stopwatch* untuk menghitung waktu pembuatan preparat, *Water bath* digunakan mengembangkan preparat, *Cover glass* untuk menutup preparat, *Object glass* sebagai tempat preparat dan mikroskop cahaya untuk mengamati preparat .

3. Bahan

Bahan-bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah 20 ekor mencit (*Mus musculus* L.) jantan berumur \pm 4 bulan dengan berat \pm 40 gram, pelet ayam sebagai pakan mencit, *Buffer formalin* untuk mengawetkan organ ginjal, Aquades, Alkohol 80 %, Alkohol 95%, Alkohol 96%, Alkohol absolute digunakan untuk proses dehidrasi atau menarik kandungan air dari sediaan, Xylol untuk membersihkan alcohol kembali, paraffin cair (titik didih 56^0 - 80^0 C) untuk filtrasi, Pewarna *Harris*, *Hematoxilen eosin* untuk mewarnai preparat, dan *Canada Balsam* untuk menempelkan cover glass .

C. Pelaksanaan Penelitian

1. Perlakuan Hewan Uji

Sebanyak 20 ekor mencit jantan dipelihara dalam kandang di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Lampung . Kelompok hewan percobaan ditempatkan ke dalam kandang yang dindingnya dilengkapi lempeng tembaga yang berfungsi sebagai elektroda pembangkit tegangan listrik mengalirkan medan listrik statis. Lempeng tembaga dihubungkan dengan sumber tegangan dari transformator yang outputnya dialiri dari 0-40 kV.

Pada penelitian pajanan medan listrik yang digunakan adalah pada 5kV, 6kV, dan 7 kV, masing-masing selama 8 jam/hari selama 37 hari.

2. Pembuatan Preparat Histologi Organ Ginjal

Pada hari ke 37 semua mencit yang telah menerima pajanan medan listrik tegangan tinggi yang telah diambil darahnya, dikorbankan dengan cara dislokasi selokasi serviks, dimana setiap mencit diambil organ ginjalnya untuk diamati secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan makroskopik dilakukan dengan melihat perubahan warna dan bentuk secara *in situ*.

Erpek dkk (2007), menggunakan pewarnaan HE(*Haematoxylin-Eosin*) untuk melihat perubahan histologi pada testis tikus akibat medan listrik frekuensi 50 Hz. Hal serupa juga dilakukan oleh Glaib dkk (2007), dalam pengamatan mikroskopik organ hati dan ginjal pada mencit akibat efek radiasi elektromagnetik telepon seluler . Sehingga dalam penelit

dibuat sediaan histologi dengan menggunakan pewarnaan HE (*Haematoxylin-Eosin*).

Langkah-langkah pembuatan preparat histologi ginjal adalah sebagai berikut :

a. Fiksasi

Spesimen hasil nekropsi berupa organ ginjal kelompok kontrol (K), hewan jantan tidak terpajan medan listrik; , kelompok perlakuan (P1), hewan jantan terpajan medan listrik (5 kV/m), kelompok perlakuan (P2), hewan jantan terpajan medan listrik (6 kV/m). kelompok perlakuan (P3), hewan jantan terpajan medan listrik (7 kV/m), segera dimasukkan ke dalam larutan fiksatif (pengawet), *Buffer formalin* 10%. Perbandingan antara volume specimen dengan larutan 1 : 10 untuk mendapatkan hasil yang baik.

b. Trimming

Trimming merupakan tahapan yang dilakukan setelah fiksasi, dimana *Buffer formalin* 10% dihilangkan dengan menggunakan air mengalir. Adapun tahapan-tahapannya adalah sebagai berikut :

1. Spesimen berupa potongan organ yang dicuci dengan air yang mengalir. Jaringan dipotong setebal 2-4 mm.
2. Potongan-potongan jaringan tersebut dimasukkan ke dalam *Embedding cassette*. Tiap *Embedding cassette* berisi 1-5 buah potongan jaringan yang disesuaikan dengan besar kecilnya potongan.

3. Potongan jaringan dicuci di bawah air yang mengalir selama 30 menit.

c. Dehidrasi

Dehidrasi dilakukan setelah proses trimming. Proses untuk mengeluarkan air yang terkandung dalam jaringan, dengan cara :

1. *Embedding cassette* diletakkan di atas tissue untuk mengeringkan air.
2. Potongan jaringan berturut-turut diberikan perlakuan sebagai berikut secara berurutan :

Proses	Reagensia	Waktu
Dehidrasi	Alkohol 80 %	2 jam
	Alkohol 95 %	2 jam
	Alkohol 95%	2 jam
Clearing	Alkohol absolut I	1 jam
	Alkohol absolut II	1 jam
	Alkohol absolut III	1 jam
	Xylol I	1 jam
	Xylol II	1 jam
	Xylol III	1 jam
Impregnasi	Parafin I	2 jam
	Parafin II	2 jam
	Parafin III	2 jam

d. Embedding

Embedding merupakan proses pencetakan organ ginjal dengan menggunakan paraffin cair sebagai media sehingga mempermudah proses pemotongan (cutting). Tahapan embedding adalah sebagai berikut:

1. Sisa-sisa paraffin yang ada pada “pan” dibersihkan dengan memanaskan di atas api beberapa saat dan diusapkan dengan kapas.

2. Paraffin cair disiapkan dan dimasukkan ke dalam cangkir logam, kemudian diletakkan ke dalam oven dengan suhu 58⁰C.
3. Paraffin cair dituangkan ke dalam *pan*.
4. Jaringan satu persatu dipindahkan ke dalam dasar *pan* dengan mengatur jarak satu dengan yang lainnya.
5. *Pan* diapungkan di atas air dengan tujuan agar paraffin cepat dingin.
6. Setelah dingin dan mengeras, *pan* dimasukkan ke dalam *refrigerator*, untuk mempermudah melepaskan paraffin dari *pan*.
7. Paraffin dipotong-potong sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan pisau skapel yang dipanaskan terlebih dahulu.
8. Paraffin diletakkan pada balok kayu, diratakan pinggirnya dan ujungnya dibuat sedikit meruncing. Blok paraffin siap dipotong dengan menggunakan mikrotom.

e. Cutting

Cutting adalah pemotongan halus jaringan dengan ketebalan 4-5 mikron sehingga mempermudah dalam proses pengamatan preparat.

Cutting dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Pemotongan dilakukan pada ruang dingin.
2. Sebelum dipotong, blok paraffin dimasukkan ke dalam *refrigerator*.
3. Terlebih dahulu dilakukan pemotongan kasar, dan dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 5 mikrometer.

4. Setelah dipotong, dipilih potongan yang paling baik lalu diapungkan pada air dan dihilangkan kerutannya dengan cara ditekan dengan jarum dan sisi yang lainnya ditarik dengan menggunakan kuas.
5. Lembaran jaringan tersebut dipindahkan ke dalam *water bath* sampai beberapa detik sehingga menembang sempurna.
6. Dengan gerakan menyendok, jaringan tersebut diambil dengan objek glass bersih dan ditempatkan ditengah atau sepertiga atas atau bawah, diusahakan jangan sampai ada gelembung udara dibawah jaringan.
7. Slide yang berisi jaringan di tempatkan pada inkubator (suhu 37⁰C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

f. Staining/ pewarnaan

Sebelum dilakukan proses pewarnaan / staining dilakukan pembuatan pewarnaan Harris Hematoxylin Eosin. Bahan dan cara kerja adalah sebagai berikut :

Bahan pewarnaan :

- | | |
|--------------------------------|-----------|
| a. Hematoxylin kristal | : 5 g |
| b. Alkohol absolut | : 50 g |
| c. Ammonium (potassium alkena) | : 100 g/L |
| d. Aquadest | : 1000mL |
| e. <i>Mercury oxide</i> | : 2,5 g |

Cara kerja :

Larutan potassium alum (ammonium) dimasukkan ke dalam air dan dipanaskan, kemudian ditambahkan Hematoxylin kristal yang telah dilarutkan pada alkohol absolut. Campuran larutan tersebut dididihkan selama 1 menit sambil diaduk, lalu secara perlahan-lahan ditambahkan *mercury oxide* sampai berwarna jingga gelap. Setelah itu, larutan dikeluarkan dari panas dan segera didinginkan. Untuk memperjelas pewarnaan inti ditambahkan 2-4 mL asam asetat glacial per 100 mL larutan. Larutan ini perlu disaring sebelum digunakan (Luna, 1968).

Setelah pembuatan pewarnaan Harris Hematoxylin Eosin, dipilih slide yang terbaik, selanjutnya slide tersebut dimasukkan ke dalam rak khusus untuk staining yang memuat beberapa slide, sehingga memungkinkan slide dimasukkan secara bersama-sama, selanjutnya slide tersebut dicelupkan secara berurutan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan memperlihatkan waktu yang telah ditentukan sebagai berikut :

No	Reagensia	Waktu
1	Xylol I	5 menit
2	Xylol II	5 menit
3	Xylol III	5 menit
4	Alkohol absolut I	5 menit
5	Alkohol absolut II	5 menit
6	Aqudes	1 menit
7	Harris-haemotoxylin	20 menit
8	Aqudes	1 menit
9	Acid –alkohol	2-3 celupan
10	Aqudes	1 menit
11	Aqudes	15 menit
12	Eosin	2 menit
13	Alkohol 96% I	3 menit
14	Alkohol 96% II	3 menit
15	Alkohol absolut III	3 menit
16	Alkohol absolut IV	3 menit
17	Xylol IV	5 menit
18	Xylol V	5 menit

g. Mounting

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

h. Pengamatan

Preparat yang telah jadi di amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100X, 200X, 400X, hasilnya inti berwarna biru dan sitoplasma berwarna merah jambu.

D. Parameter yang Diamati

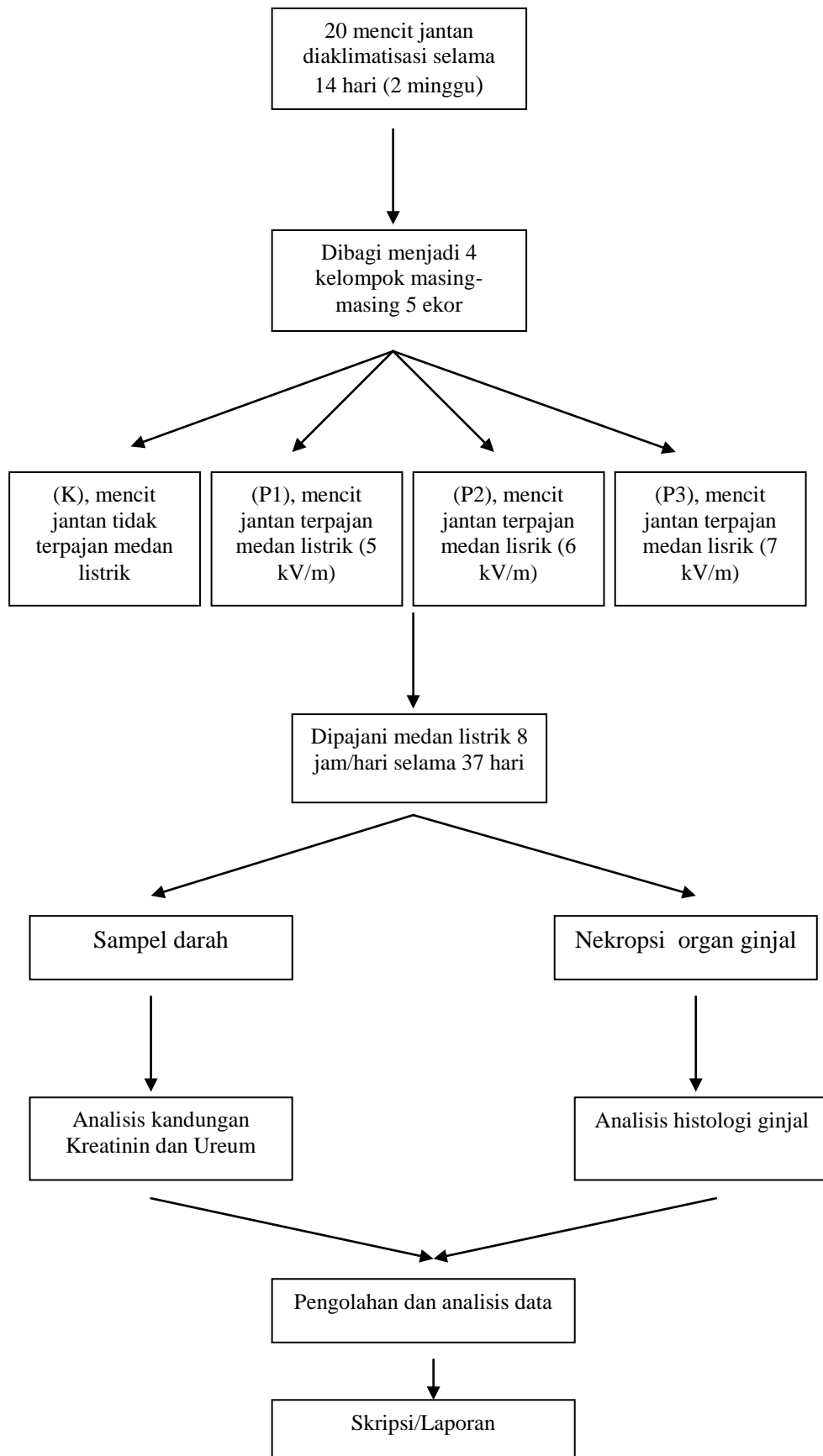
Pada penelitian ini parameter yang diamati, yaitu berupa jumlah glomerulus (normal ataupun mengalami kerusakan) dan histopatologi organ ginjal akibat pajanan medan listrik tegangan tinggi.

E. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Mencit (*Mus musculus* L.) percobaan dibagi ke dalam 4 kelompok masing-masing 5 ekor, kelompok kontrol (K), hewan jantan tidak terpajan medan listrik; , kelompok perlakuan (P1), hewan jantan terpajan medan listrik (5 kV/m), kelompok perlakuan (P2), hewan jantan terpajan medan (6 kV/m). kelompok perlakuan (P3), hewan jantan terpajan medan listrik (7 kV/m) yang setiap perlakuan diulang 5 kali. Metode yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan 4 perlakuan dan 5 pengulangan. Pengamatan dilakukan dengan menghitung penurunan jumlah glomerulus dan jumlah perdarahan glomerulus.

Data penurunan jumlah glomerulus dan jumlah perdarahan glomerulus dianalisis dengan analisis ragam (ANARA). Apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada taraf nyata 5% untuk perbandingan masing-masing kelompok.

F. Diagram Alir Penelitian



[Type text]