

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi dan Fisika FMIPA Universitas Lampung dan pembuatan preparat histologi hati 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

Pada percobaan menggunakan hewan mencit jantan (*Mus musculus L.*) sebanyak 20 ekor yang berumur 3 bulan dengan berat badan 30-40 gram. Sebelum diberi perlakuan semua hewan percobaan diaklimatisasi selama satu minggu serta diberi pakan dan minuman secara *ad libitum*.

Perlakuan mencit dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing terdiri dari 5 ulangan, yaitu hewan jantan tidak terpajan medan listrik sebagai kelompok kontrol (K), hewan jantan terpajan medan listrik (5 kV/m) sebagai kelompok perlakuan (P1), hewan jantan terpajan medan listrik (6 kV/m) sebagai kelompok perlakuan (P2), dan hewan jantan terpajan medan listrik (7 kV/m) sebagai kelompok perlakuan (P3). Hewan

percobaan diperoleh dari Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III, Bandar Lampung.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Kandang hewan uji (mencit) yang digunakan sebagai tempat perlakuan mencit, lempeng logam elektroda yang digunakan untuk mengalirkan arus medan listrik, *electric power supply* yang digunakan untuk mengatur arus medan listrik, tabung serum darah yang digunakan untuk menyimpan darah mencit jantan, botol spesimen yang digunakan untuk menyimpan spesimen, alat bedah yang digunakan dalam proses pemotongan jaringan, mikrotom geser yang digunakan untuk memotong jaringan, *pan*, lampu gas, oven, kuas, stik berujung runcing, mikrotom geser, gunting tulang, balok kayu (3 x 2 cm), *Embedding cassette*, *Staining jar*, *Refrigator*, *Stopwatch*, *Water bath*, *Cover glass*, *Object glass* dan mikroskop.

3. Bahan

Bahan-bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah organ tubuh mencit jantan, *Aluminium foil*, kertas saring, kapas, tissue, *Buffer formalin*, Aquades, Alkohol 80 %, Alkohol 95%, Alkohol 96%, Alkohol absolute, Xylol, Parafin, Pewarna *Harris*, *Hematoxilen eosin*, dan *Acid alcohol*.

C. Pelaksanaan Penelitian

1. Penelitian mencit (*Mus musculus L.*)

Pelaksanaan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Lampung dengan menggunakan mencit sebanyak 20 mencit jantan dipelihara dalam kandang. Mencit percobaan ditempatkan ke dalam kandang dilapisi bahan tembaga dengan ukuran 20 x 75 cm sebanyak 5 kandang. Masing-masing kandang disekat-sekat menjadi 5 bagian. Kedua lempengan tersebut dipasang vertikal pada sebuah papan. Lempeng tembaga dihubungkan dengan transformator pengubah arus AC ke DC. Perkembangan berat badan mencit diamatai dengan menimbanginya setiap 6 hari sekali, sedangkan gejala klinik yang timbul diamati setiap hari.

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

Setelah mencit diberi perlakuan selama 37 hari, pada hari ke-38 dilakukan pembedahan untuk diambil organ hatinya. Sebelum dilakukan pembedahan mencit terlebih dahulu dibius dengan *kloroform*, kemudian setelah mencit tidak bergerak lagi mulailah dilakukan pembedahan pada bagian ventral tubuh mencit secara vertikal. Spesimen dibuka perutnya dan diambil hatinya. Hati yang telah diambil segera difiksasi dengan larutan *formalin* 10% atau 10% *formolsaline* (1 bagian *formalin* dalam 9 bagian NaCl – fisiologis) di dalam botol. Perbandingan volume specimen dengan larutan *formalin* 1 : 10, guna mendapatkan hasil fiksasi yang sempurna. Kemudian hati tersebut segera dibawa ke Laboratorium Patologi Balai Penyidikan

dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung untuk dibuat preparat histologinya, sehingga hati dapat diamati.

3. Pembuatan Preparat Histologi Organ Hati Mencit Jantan (*Mus musculus* L.)

Adapun prosedur pembuatan preparat histologi yang dilakukan terhadap organ hati meliputi *fiksasi*, *trimming*, *dehidrasi*, *clearing*, *impregnasi*, *embedding*, *cutting*, *staining* dan *mounting*. Berikut adalah uraian tahapan pembuatan preparat adalah sebagai berikut (Tim Patologi, 2007).

a. Fiksasi

Spesimen hasil nekropsi berupa organ hati baik dari kelompok control dan hewan yang terpajan medan listrik segera dimasukkan ke dalam larutan fiksasif (pengawet), *Buffer formalin* 10%. Perbandingan antara volume spesimen dengan larutan 1 : 10 untuk mendapatkan hasil yang baik. Tujuan dilakukannya *fiksasi* yaitu untuk manghindari kemungkinan rusaknya organ sebelum dikakukan tahapan lainnya.

b. Trimming

Trimming yaitu suatu proses pemotongan organ secara tipis (± 4 mm) dengan orientasi sesuai organ yang akan dipotong dengan menggunakan pisau skapel.

Trimming dilakukan setelah proses fiksasi dengan menggunakan larutan *buffer formalin* 10%, dengan perbandingan antara volume spesimen dengan larutan 1 : 10 untuk mendapatkan hasil yang baik.

Potongan organ tersebut dimasukkan ke dalam *embedding cassette*, tiap *embedding cassette* berisi 1 – 5 buah potongan jaringan organ yang disesuaikan dengan besar kecilnya potongan. Kemudian dicuci di bawah air mengalir selama 30 menit.

c. Dehidrasi

Dehidrasi dilakukan dengan tujuan untuk menghilangkan kandungan air didalam jaringan. Organ diletakkan di atas tisu untuk mengeringkan air. Proses ini dilakukan dengan menggunakan alat *Embedding cassette* Kemudian diberi perlakuan sebagai berikut secara berurutan :

Tabel 1. Tahapan proses dehidrasi

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

d. Embedding

Setelah proses dehidrasi, siapkan *paraplast* cair dengan *paraplast* dimasukkan ke dalam cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu di atas 58⁰C. Tuangkan *paraplast* cair ke dalam *pans*. Potongan organ satu persatu dipindahkan dari *embedding cassette* ke dasar *pans* dengan mengatur jarak satu dengan yang lainnya. *Pans* dimasukkan atau diapungkan di dalam air. *Paraplast* yang berisi jaringan dilepaskan dari *pans*, *paraplast* dipotong- potong sesuai dengan letak jaringan dengan menggunakan *skalpet* atau pisau hangat. Kemudian letakkan pada balok kayu yang berfungsi untuk dipegang saat dipotong dengan mikrotom, pinggirnya diratakan dan pada bagian ujungnya dibuat sedikit meruncing. Blok *paraplast* siap dipotong dengan menggunakan mikrotom.

e. Cutting

Cutting adalah proses pemotongan jaringan dengan menggunakan mikrotom yang terlebih dahulu didehidrasi. Proses ini dilakukan di dalam ruangan dingin. Sebelum dipotong, blok terlebih dahulu didinginkan, pemotongan dilakukan secara kasar dan halus, selanjutnya blok dipotong dengan ketebalan 4 -5 μm . Setelah blok dipotong, pilih lembaran yang baik, apungkan pada air dan kerutannya dihilangkan dengan cara salah satu sisi lembaran jaringan tersebut ditekan dengan ujung jarum, di sisi lain ditarik dengan kuas runcing. Lembaran jaringan tersebut ke dalam *waterbath* selama beberapa detik sampai

menggembung sempurna. Kemudian lembaran jaringan tersebut dipindahka ke dalam *waterbath* selama beberapa detik sampai menggembung sempurna.

Dengan gerakan disedot, jaringan tersebut diambil dengan *slide* bersih dan tempelkan di tengah atau sepertiga atas/bawah. Dicegah agar jaringan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan. Kemudian slide jaringan ditempatkan pada inkubator (37⁰C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

f. Staining (pewarnaan)

Setelah pembuatan *slide* preparat selesai, dilakukan pengamatan dibawah mikroskop untuk melihat preparat yang terbaik sebelum dilakukan pewarnaan. Proses selanjutnya adalah pewarnaan dengan menggunakan pewarna HE (*Hematoxilin-Eosin*), secara berurutan *slide* dimasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut :

Tabel 2. Tahapan proses staining (pewarnaan)

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
Aquades	1 menit
<i>Harris Hematoxylin</i>	20 menit
Aquades	1 menit
Acid alkohol	2 – 3 celupan
Aquades	1 menit
Aquades	15 menit
<i>Eosin</i>	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

g. Mounting

Setelah proses pewarnaan selesai *slide* ditempatkan di atas tisu pada tempat yang datar, tetesi bagian atas *slide* dengan bahan *mounting* yaitu *canada balsam* dan langsung ditutup dengan *cover glass* dengan cepat agar tidak ada gelembung udara.

h. Pembacaan Slide Dengan Mikroskop

Slide yang telah jadi diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40x, 100x, 200x atau 400x. Pada hasil *slide* yang baik, akan terlihat inti sel berwarna biru dan sitoplasma berwarna merah jambu.

D. Parameter yang Diamati

Pada penelitian ini parameter yang diamati adalah perubahan struktur histologi berdasarkan jumlah vena dan kongesti pada vena organ hati mencit setelah pajanan listrik tegangan tinggi. Dimana kongesti adalah adalah terjadinya pembendungan darah pada hati yang disebabkan adanya gangguan sirkulasi yang dapat mengakibatkan kekurangan oksigen dan zat gizi.

E. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Mencit percobaan dibagi ke dalam 4 kelompok, masing-masing P0 (Kontrol, P1(5kV), P2 (6kV), dan P3 (7kV) dimana setiap perlakuan terdiri dari 5 ekor. Data hasil penelitian dianalisis dengan Analisis Ragam (ANARA). Jika terjadi perbedaan nyata, maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji BNT pada taraf 5%. Sedangkan data hasil pemeriksaan histologi organ hati mencit dianalisis secara deskriptif.