

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Zoologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan uji, sedangkan pembuatan preparat histopatologi ginjal dilaksanakan di Laboratorium Patologi Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Oktober sampai November 2012.

B. Alat dan Bahan Penelitian

1. Hewan Percobaan

Penelitian ini menggunakan obyek penelitian berupa mencit jantan (*inbreed mice*) dengan berat rata-rata 30-35 gram (dewasa normal). Dua puluh ekor mencit (*Mus musculus* L) jantan dewasa diperoleh dari Bagian *Breeding* BPPV Regional III Bandar Lampung berumur delapan minggu. Mencit-mencit tersebut diaklimatisasi selama tujuh hari.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : kandang kayu standar untuk tikus yang tutup logamnya telah diganti dengan bahan dari plastik untuk menghindari interferensi gelombang radiasi. Kandang berbentuk kotak berukuran 22 x 15 x 6 cm sebanyak 20 kandang yang mana dimensinya diatur agar radiasi cahaya lampu merkuri dapat menyebar secara merata di dalam kandang. Lampu merkuri 160 watt (intensitas 1900 lux di dalam kandang) dan isolatornya, alat ukur intensitas sinar UV (luxmeter), gelas kimia, termometer, timbangan mencit, kotak mencit, papan fiksasi, makanan mencit, botol minuman mencit dengan pipa aluminium, lampu merkuri *low pressure* dengan tegangan 160 watt, alat bedah minor, kaca penutup (*cover glass*), *object glass*, stopwatch, dan mikroskop.

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. Desain Penelitian

Untuk mendapatkan informasi pengaruh radiasi gelombang elektromagnetik dari lampu merkuri terhadap mencit digunakan eksperimen. Perlakuannya adalah pemajanan dengan lampu merkuri yang terdiri dari 5 taraf yaitu 0 jam/hari, 4 jam/hari, 8 jam/hari, 12 jam/hari, dan 16 jam/hari selama 21 hari. Menurut Supranto (2000) untuk penelitian eksperimen secara sederhana dapat dirumuskan:

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15 \quad \text{atau} \quad t(r - 1) \geq 15$$

dimana : t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi

Maka dalam 5 buah perlakuan, jumlah ulangan untuk tiap perlakuan dapat dihitung:

$$5(r-1) \geq 15$$

$$(5r-5) \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan Lampu Merkuri dan Isolatornya

Daya lampu merkuri 160 watt (setara dengan 1950 lux di dalam kandang) digunakan untuk memapari mencit dengan luasan permukaan yang tetap. Sumber radiasi ditempatkan dengan variasi pemaparan dilakukan pada beberapa selang waktu pemaparan, yaitu : 0 jam/hari,

4jam/hari, 8jam/hari, 12jam/hari, dan 16jam/hari. Untuk mencegah interferensi dari sumber cahaya yang lain, maka digunakan kandang atau isolator yang berbentuk persegi panjang berukuran 22 x 15 x 6cm dan terbuat dari kayu dengan tebal 3 cm.

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

Mencit yang digunakan adalah mencit jantan sebanyak 20 ekor dengan berat rata-rata 30 - 35 gram dengan usia 3 - 4 bulan (dewasa normal). Mencit ini diperoleh dari Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung. Diberi makan pelet komersial tikus atau hewan pengerat dan minum (Air PAM) disuplai secara berlebih, serta ditempatkan dalam lingkungan yang terkendali (24 jam siklus gelap / sedikit interferensi cahaya), suhu kamar dibiarkan secara alamiah dan kelembaban dibiarkan pada kisaran alamiah. Desain penelitian ini merupakan hasil modifikasi prosedur penelitian yang telah dilakukan oleh Fidan *et al.*, (2008) dan merupakan jenis penelitian eksperimental dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design*.

Penelitian ini menggunakan pajanan gelombang elektromagnetik berupa cahaya tampak yang dihasilkan oleh radiasi lampu merkuri sebagai bentuk perlakuan terhadap objek penelitian. Adapun cara pajanan radiasi cahaya lampu merkuri adalah sebagai berikut :

1. Aklimatisasi mencit selama 7 hari.

2. Mencit ditempatkan pada ruangan fiksasi dan dilakukan pencahayaan dengan lampu merkuri yang diletakkan pada jarak 1,5 meter dari mencit.
3. Duapuluh ekor mencit jantan dewasa dibagi ke dalam limakelompok yang masing-masing terdiri dari empat ekor mencit. Ke-lima kelompok tersebut meliputi :

1. Kelompok kontrol : tidak dipajankan terhadap gelombang elektromagnetikdari lampu merkuri.
2. Kelompok intensitas I: dipajankan terhadap lampu merkuri dengan intensitas 4jam/hari selama 21 hari.
3. Kelompok intensitas II: dipajankan terhadap lampu merkuri dengan intensitas 8jam/hari selama 21hari.
4. Kelompok intensitas II : dipajankan terhadap lampu merkuri dengan intensitas 12jam/hari perhari selama 21 hari.
5. Kelompok intensitas III :dipajankan terhadap lampu merkuri dengan intensitas 16jam/hari selama 21 hari.

3. Nekropsi dan Pengambilan Sampel Organ

Setelah masa perlakuan berakhir, mencit-mencit ini kemudian dibunuh dengan cara dislokasi leher. Kemudian dilakukan nekropsi untuk pengambilan ginjal. Organ ini akan dijadikan sediaan histopatologi untuk diambil data-datanya, yang akan menjadi bukti ilmiah tentang efek pajanan lampu merkuri. Pada awal proses pembuatan sediaan histopatologi, hewan

yang telah dinekropsi diambil bagian ginjalnya, kemudian diawetkan di dalam larutan formalin 10%. Setelah larutan berpenetrasi sempurna ke dalam organ, langkah selanjutnya adalah *grossing* (memilih bagian dari organ yang akan dijadikan sediaan histopatologi) kurang lebih dengan pemotongan setebal 0,5 cm (Samkhan dan Sri, 2006).

4. Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal

Menurut Wararindi (2011) pembuatan preparat organ ginjal meliputi *fiksasi, washing, dehidrasi, clearing, impregnasi, embliding, cutting, staining dan mounting*.

1. Fiksasi

Fiksasi adalah suatu usaha manusia untuk mempertahankan elemen - elemen sel atau jaringan agar tetap pada tempatnya dan tidak mengalami perubahan bentuk maupun ukuran. Larutan ini dinamakan Bouins, larutan ini berfungsi sebagai larutan fiksatif karena kemampuannya membuat jaringan mudah menyerap warna. Ginjal diambil lalu dipotong melintang dengan ukuran ± 50 mm. Potongan Organ tersebut dimasukkan ke dalam botol yang berisi larutan Bouins dan didiamkan selama ± 24 jam.

2. Washing

Washing adalah proses pencucian untuk menghilangkan larutan fiksasi dari jaringan. Dalam proses *washing* diusahakan tidak terdapat molekul-molekul fiksatif yang tertinggal di dalam jaringan. Molekul

ini akan menjadi penghalang untuk proses selanjutnya. Fiksatif menggunakan Bouins, maka setelah kurang lebih 24 jam difiksasi kemudian dilakukan pencucian menggunakan alkohol 70% yang diganti berkali-kali hingga warna kuning hilang.

3. *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. Dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dari persentase rendah ke persentase tinggi (70%, 80%, 96%) masing-masing 2 x 15 menit. Hal ini dilakukan untuk menjaga agar tidak terjadi perubahan tiba-tiba pada sel dan jaringan.

4. *Clearing*

Clearing adalah proses penjernihan atau mentransparankan jaringan. *Clearing* berfungsi untuk menarik alkohol atau dehidran yang lain dari dalam jaringan agar dapat digantikan oleh molekul parafin. *Clearing* menggunakan xilen dengan membenamkan jaringan pada larutan tersebut selama 2 x 15 menit.

5. *Impregnasi*

Impregnasi bisa juga disebut infiltrasi parafin yaitu proses pengeluaran xilen dari dalam jaringan yang akan digantikan oleh parafin cair.

Setelah jaringan di *Clearing* maka sampel dimasukkan kedalam *cessed and deckel* kemudian dimasukkan kedalam *molddray* yang berfungsi sebagai tempat infiltrasi parafin, yang terdiri dari tiga wadah yaitu:

pertama berisi parafin cair dan xilen, wadah ke dua berisi parafin cair tanpa xilene, dan wadah ke tiga berisi parafin cair murni. Masing-masing 1 x 15 menit.

6. *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 *molddray*, kemudian menanamnya ke dalam lempengan blok yang berisi parafin cair. Setelah itu tutup dengan menggunakan *casette* and *deckel* lalu didinginkan pada *cold plate*.

7. *Cutting*

Proses pemotongan atau pengirisan jaringan dengan menggunakan mikrotom. Sampel yang dipotong tebalnya sekitar 5 – 7 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.

8. *Staining*

Staining adalah proses pewarnaan, dimana sampel diwarnai dengan menggunakan zat warna. Tujuannya yaitu untuk mewarnai jaringan sehingga mudah diamati di mikroskop. Tahapan *staining* terdiri dari proses deparafinasi atau penarikan parafin dari dalam jaringan. Proses

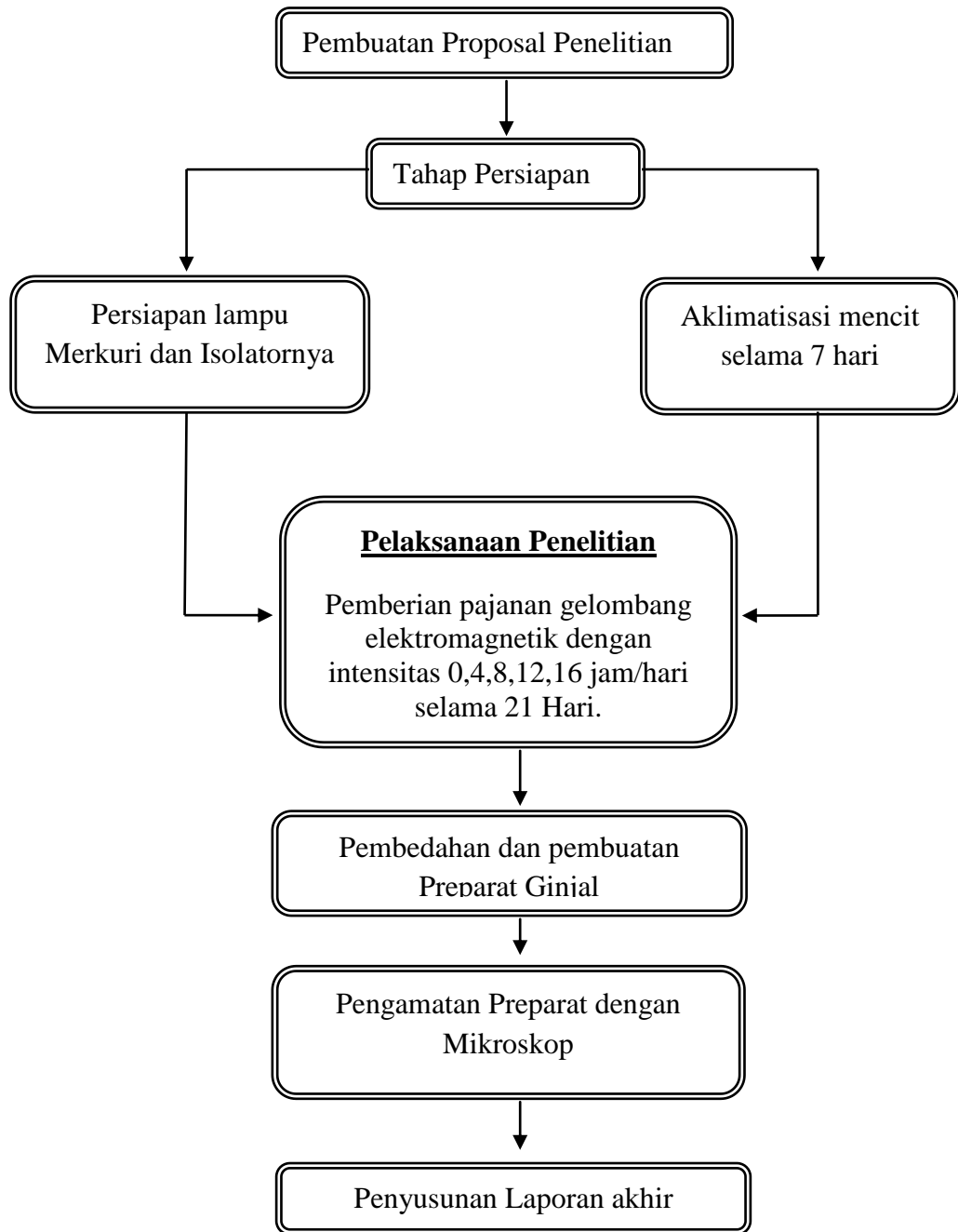
rehidrasi atau pemasukan molekul air ke dalam jaringan yang dilakukan secara bertahap dengan menggunakan alkohol bertingkat dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah. Proses ini sebagai media penghantar zat warna ke jaringan. Selanjutnya proses infiltrasi zat warna. Menggunakan HE (Haematoxilin) dan eosin untuk mewarnai sitoplasma dan Eosin untuk mewarnai inti sel. Lalu dehidrasi kembali yang bertujuan untuk mencegah kerusakan pada jaringan karena mengakibatkan terjadinya pembusukan. Setelah parafin dikeluarkan dengan menggunakan xilen selama 20 menit preparat dikeringkan dan ditetesi dengan entelan dan ditutup dengan *cover glass*. Kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x.

5. Variabel Pengamatan

Variabel yang diteliti dibedakan kedalam dua kategori, variabel pertama yaitu variabel bebas atau *independent variable* dimana pemberian pemajanan dengan perlakuan 0 jam/hari (sebagai kontrol), 4 jam/hari, 8 jam/hari, 12 jam/hari, dan 16 jam/hari selama 21 hari sebagai variabel bebas. Variabel yang kedua yaitu variabel terikat (*dependent variable*) yaitu kerusakan yang terjadi pada histopatologi tubulus ginjal mencit jantan.

6. Pengolahan data

Pengolahan data dilakukan secara deskriptif dengan menyajikan hasil penelitian berupa gambar-gambar tubulus ginjal mencit antar perlakuan.



Gambar 7. Diagram alir penelitian