

### **III. METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung untuk pemeliharaan dan pemberian perlakuan pada mencit, sedangkan pembuatan preparat histologi hati dilaksanakan di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Oktober sampai dengan bulan November 2012.

#### **B. Alat dan Bahan**

##### **1. Hewan Percobaan**

Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus* L.) jantan yang berasal dari BPPV Regional III sebanyak 20 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 plastik untuk menghindari gelombang radiasi. Sumber dari radiasi elektromagnetik menggunakan lampu merkuri 16 watt dan isolatornya, sebelum lampu merkuri digunakan terlebih dahulu dilakukan pengukuran untuk intensitas cahaya lampu merkuri dengan menggunakan alat Lux Meter, alat lainnya yang digunakan adalah gelas kimia, timbangan mencit, kandang mencit, papan fiksasi, botol minum mencit, kaca penutup (*cover glass*), stopwatch, dan mikroskop.

## 3. Bahan

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

## C. Pelaksanaan Penelitian

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

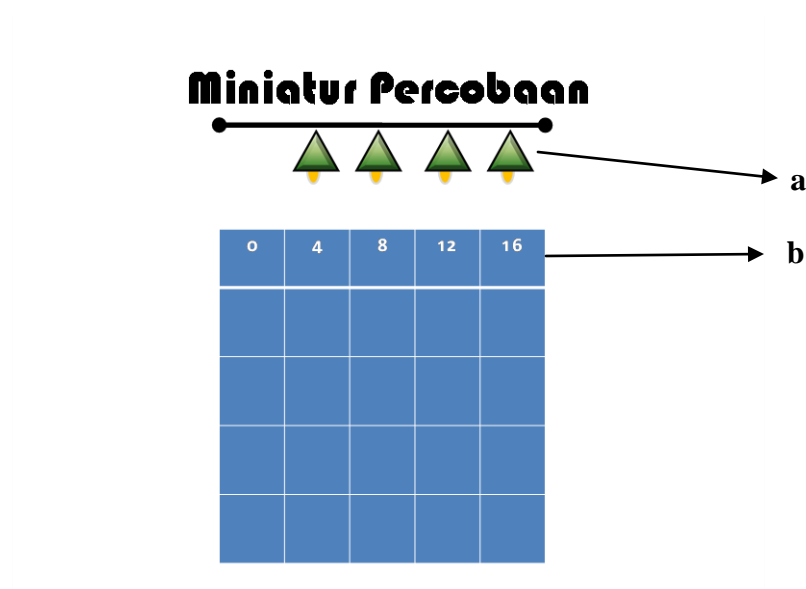
Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung dengan menggunakan 20 ekor mencit jantan. Mencit ditempatkan di dalam kandang yang diberi sekat menjadi lima bagian. Mencit yang digunakan rata-rata mempunyai berat sekitar 30-35 gram dengan usia 3-4 bulan, 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 terkendali (24 jam siklus gelap suhu kamar dipertahankan pada  $27 \pm 2$  ° C, dengan kelembaban relatif pada  $55 \pm 10\%$ ) (Fidan *et al*, 2008).

Pajanan yang diberikan sebagai perlakuan terhadap mencit adalah sebagai berikut:

1. Mencit ditempatkan pada ruangan yang akan diberi pencahayaan dengan lampu merkuri yang berjarak 1,5 meter dari tempat mencit berada.
2. Dua puluh ekor mencit jantan dewasa dibagi mejadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok tersebut terdiri dari empat ekor mencit jantan dewasa. Berikut adalah uraian dari masing-masing kelompok :
  - a. Kelompok kontrol (P0) : kelompok kontrol ini tidak diberikan perlakuan pajanan lampu merkuri karena sebagai pembanding yang

normal terhadap kelompok mencit yang diberikan perlakuan pajanan gelombang elektromagnetik dari lampu merkuri.

- b. Kelompok pajanan I (P1): kelompok ini diberi pajanan radiasi lampu merkuri dengan lama pajanan 4 jam per hari selama 21 hari.
- c. Kelompok pajanan II (P2): kelompok ini diberi pajanan radiasi lampu merkuri dengan lama pajanan 8 jam per hari selama 21 hari.
- d. Kelompok pajanan III (P3): kelompok ini diberi pajanan radiasi lampu merkuri dengan lama pajanan 12 jam per hari selama 21 hari.
- e. Kelompok pajanan IV (P4): kelompok ini diberi pajanan radiasi lampu merkuri dengan lama pajanan 16 jam per hari selama 21 hari.



Gambar 6. Tata letak percobaan

Keterangan : a. Lampu merkuri  
b. Kandang mencit

## **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 hati dari mencit tersebut. Pembedahan ini dilakukan dengan cara pembiusan mencit menggunakan kloroform, setelah mencit pingsan, dilakukan pembedahan pada bagian ventral tubuh mencit secara vertikal, lalu diambil organ hatinya. Hati 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 hati tersebut dibawa ke laboratorium Patologi, Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung, untuk seterusnya dibuat preparat histologinya, sehingga dapat diamati sel hepatositnya.

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

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

### **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 hati yang berasal dari

kelompok kontrol dan kelompok hewan yang diberikan perlakuan pajanan gelombang elektromagnetik dimasukkan ke dalam larutan fiksatif (pengawet), *buffer formalin* 1:10.

**b. Trimming**

Trimming adalah suatu proses tahapan yang dilakukan setelah proses 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 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%

<b>Clearing</b>	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
<b>Impregnasi</b>	2 jam	Parafin I
	2 jam	Parafin II
	2 jam	Parafin III

#### **d. Embedding**

Setelah proses dehidrasi selesai lalu disiapkan *paraplast* cair dan dimasukkan ke dalam cangkir logam, kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu di atas 58°C. *Paraplast* cair dimasukkan ke dalam *pan*. Potongan organ hati satu persatu dimasukkan ke dasar *pans*. *Pan* di masukkan dalam air. *Parplast* dilepaskan dari *pans* lalu *paraplast* dipotong-potong dengan menggunakan *skalpet* atau pisau hangat. *Paraplast* yang sudah dipotong diletakkan pada balok kayu lalu blok *paraplast* dipotong dengan menggunakan mikrotom.

**e. *Cutting***

*Cutting* adalah pemotongan jaringan dengan ketebalan 4-5 mikron sehingga mempermudah dalam proses pengamatan preparat. Proses ini dilakukan di ruangan dingin, sebelum dilakukan pemotongan blok terlebih dahulu didinginkan. Setelah dipotong lembaran diapungkan pada air dan kerutannya dihilangkan dengan cara satu sisi lembaran jaringan tersebut ditekan dengan ujung jarum, di sisi lain ditarik dengan kuas runcing. Potongan lembaran jaringan tersebut dimasukkan ke dalam *waterbath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna. Lalu jaringan diambil dengan slide bersih dan ditempelkan di tengah atau sepertiga atas/bawah. Kemudian slide jaringan ditempatkan pada inkubator (37°C) selama 24 jam sampai melekat sempurna.

**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 absolute : 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 *Canada Balsam* dan ditutup dengan *cover glass* dan dicegah jangan sampai ada gelembung udara.

**h. Pengamatan**

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

**D. Variabel Penelitian**

Pada penelitian ini terdapat 2 variabel yaitu;

1. Variabel independent (variabel bebas) meliputi pajanan intnsitas lampu merkuri yang diberikan pada kelompok perlakuan.
2. Variabel dependent (variabel terikat) perubahan yang dialami oleh sel hepatosit pada kelompok perlakuan setelah diberikan pajanan intensitas lampu merkuri.

**E. Analisis Data**

Setelah pembuatan preparat histologi organ hati selesai maka dilakukan pengamatan secara deskriptif terhadap kerusakan-kerusakan yang terjadi pada sel hepatosit.

## F. Diagram Alir Penelitian



Gambar 7. Diagram Alir Penelitian