

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Zoologi Biologi FMIPA Universitas Lampung untuk pemeliharaan, pemberian perlakuan, dan pengamatan. Proses pembuatan preparat dilakukan di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Tanjung Karang, Bandar Lampung. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Mei 2013 sampai dengan bulan Juni 2013.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit, sumber suara sebagai sumber kebisingan (pengeras bunyi / *speacker*, laptop), tempat makan mencit, tempat minum mencit, sound level meter untuk mengukur intensitas kebisingan, gunting, alat bedah, oven untuk sterilisasi, objek dan *cover glass* untuk preparat, mikroskop cahaya, mikrotom untuk membuat sayatan mikroskopis, mikrometer okuler, dan kamera.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus* L.) 25 ekor umur 3 bulan dengan berat badan rata-rata 30-40 gram. Makanan mencit berupa pellet dan air minum. Larutan formalin 10 % untuk fiksasi. Alkohol 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, dan alkohol absolut digunakan untuk dehidrasi atau menarik air dari sediaan, xylol untuk menarik alkohol kembali, parafin (titik didih 56-80⁰C) untuk filtrasi dan *embedding*, pewarna Hematoxylin Eosin untuk mewarnai preparat, dan canada balsam untuk menempelkan *cover glass*.

C. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 1 kelompok kontrol, 4 kelompok diberi perlakuan yang sama dengan perbedaan waktu pemaparan. Perlakuan yang diberikan terhadap mencit adalah kebisingan dengan intensitas 85-90 dBA. Sesuai dengan keputusan Menteri Tenaga Kerja No.51 tahun 1999, bahwa Nilai Ambang Batas Kebisingan untuk jam kerja selama 8 jam/hari adalah 85 dBA. Pada masing – masing perlakuan terdapat 5 kali ulangan. Kelompok pertama digunakan sebagai kontrol, kelompok kedua diberi pemaparan kebisingan selama 6 jam/hari, kelompok ketiga diberi pemaparan kebisingan selama 8 jam/hari, kelompok keempat diberi pemaparan kebisingan selama 10 jam/hari dan kelompok kelima diberi pemaparan kebisingan selama 12 jam/hari. Untuk mendapatkan informasi pengaruh kebisingan terhadap mencit digunakan eksperimen. Perlakuannya adalah pemaparan dengan kebisingan (bunyi)

yang terdiri dari 5 taraf yaitu 0 jam/hari, 6 jam/hari, 8 jam/hari, 10 jam/hari, dan 12 jam/hari selama 21 hari.

Adapun desain penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Desain Penelitian

Keterangan :

a : komputer (menggunakan soundcard scope sebagai sumber kebisingan)

b : pengeras bunyi

c : mencit yang diberi perlakuan

D. Cara Kerja

1. Persiapan Kandang

Sebelum penelitian ini dilaksanakan, terlebih dahulu disiapkan kandang dari bahan bak plastik dan kawat sebanyak 5 unit.

2. Pemeliharaan Mencit

Sebanyak 25 ekor mencit dibagi dalam 5 kelompok yaitu satu kelompok kontrol, dan empat kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Sebelum diberi perlakuan, semua mencit

diaklimatisasi terlebih dahulu selama satu minggu. Mencit diberi makan pellet dan air minum yang dilakukan dua kali setiap harinya, perlakuan dilakukan selama 21 hari.

3. Pemberian Perlakuan

Berdasarkan surat edaran Menteri Tenaga Kerja No. 51/1999 tentang ambang batas kebisingan yaitu ditetapkan sebesar 85 dB selama 8 jam setiap harinya dan pemberian paparan kebisingan dilakukan selama 21 hari (Marpaung, 2006). Kebisingan yang diberikan sebagai perlakuan terhadap mencit bersumber dari suara aplikasi *soundcard scope* yang diberi tambahan penguat suara dengan intensitas kebisingan 85-90 dBA. Mencit dibagi dalam lima kelompok perlakuan, masing-masing terdiri dari 5 ekor.

Perlakuan yang diberikan terhadap mencit adalah sebagai berikut:

- a. Mencit ditempatkan pada ruangan yang diberi paparan suara kebisingan yang berjarak 1 meter dari tempat mencit berada.
- b. 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 :
 - I. Kelompok kontrol (P0) : kelompok kontrol ini tidak diberi perlakuan paparan kebisingan karena sebagai kontrol, untuk perbandingan kelompok mencit yang normal dan kelompok mencit yang diberi perlakuan paparan kebisingan.

- II. Kelompok paparan I (P1): kelompok ini diberi paparan kebisingan 85-90 dB dengan intensitas paparan sebesar 6 jam per hari selama 21 hari.
- III. Kelompok paparan II (P2): kelompok ini diberi paparan kebisingan 85-90 dB dengan intensitas paparan sebesar 8 jam per hari selama 21 hari.
- IV. Kelompok paparan III (P3): kelompok ini diberi paparan kebisingan 85-90 dB dengan intensitas paparan sebesar 10 jam per hari selama 21 hari.
- V. Kelompok paparan IV (P4): kelompok ini diberi paparan kebisingan 85-90 dB dengan intensitas paparan sebesar 12 jam per hari selama 21 hari.

4. Pembedahan dan Pengawetan Jaringan

Mencit yang telah diberi perlakuan dimatikan lalu dibedah dengan menggunakan alat bedah, kemudian testisnya diambil. Pengawetan jaringan terdiri dari proses *trimming*, *dehidrasi*, *clearing*, *impregnasi* (infiltrasi parafin), *embedding* (pengeblokan jaringan), *cutting* (pemotongan jaringan), penempelan, dan pewarnaan. Organ testis yang sudah diambil difiksasi dengan merendamnya di dalam larutan formalin 10 % selama 24 jam. Testis yang sudah difiksasi kemudian dicuci dengan air mengalir sebanyak dua kali berturut-turut selama satu jam. Setelah organ testis dicuci kemudian dilakukan dehidrasi dengan cara merendam testis pada alkohol dengan konsentrasi 70 % selama dua jam, kemudian

konsentrasi 80 % selama dua jam, lalu konsentrasi 95 % selama dua jam. Kemudian alkohol 95 % satu jam dan alkohol absolut selama satu jam sebanyak tiga kali berturut-turut. Penjernihan dilakukan dengan cara merendam testis dengan xylol sampai transparan atau tenggelam. Testis direndam dalam xylol sebanyak tiga kali, selama satu jam berturut-turut.

Impregnasi dimulai dengan pemanasan parafin di oven dengan suhu 58⁰C dan ditempatkan pada tiga tempat. Potongan testis dimasukkan ke dalam tiga parafin tersebut setiap parafin dengan waktu dua jam.

Pemblokian dilakukan dengan menuangkan parafin yang telah dicairkan ke kotak yang terbuat dari kertas atau teplon. Kemudian testis dimasukkan dan diatur letaknya dengan jarum yang telah dipanaskan selama waktu infiltrasi yaitu dua jam untuk setiap parafin. Parafin dibiarkan pada suhu kamar sampai benar-benar padat, kemudian dimasukkan ke dalam air dingin sampai potongan testis terlihat dan disimpan atau didinginkan di mesin pendingin dengan suhu 4-6⁰C sampai proses pemotongan.

Pemotongan dilakukan dengan mengeluarkan parafin yang berisi potongan testis dari cetakannya. Parafin yang berisi potongan testis ditempelkan pada balok kayu dengan menggunakan balok kayu yang sudah dipanaskan, kemudian di parafin objek dipasang mikrotom sliding. Pisau mikrotom dipasang dengan tepat, kemudian diatur ukuran ketebalan dan mikrotom diberi pelumas. Parafin berisi testis dipotong setebal lima mikron.

Penempelan dilakukan dengan memindahkan lembaran jaringan yang paling baik ke dalam air hangat (suhu 40-45⁰C) selama beberapa detik dengan menggunakan kertas karton sampai mengembang sempurna. Dengan gerakan menyendok lembaran jaringan diambil dengan *object glass* dan ditempatkan di tengah pada sepertiga atas atau bawah. *Object glass* yang berisi jaringan dimasukkan ke dalam inkubator (suhu 37⁰C) selama 24 jam atau plat panas selama satu jam (suhu 50-60⁰C) sampai jaringan melekat sempurna.

Pewarnaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan Hematoxylin Eosin (HE). Preparat direndam dengan xylol I-III sampai parafin yang menempel pada kaca objek larut atau hilang, kemudian preparat dimasukkan ke dalam alkohol seri 100%, 96 %, selama dua sampai tiga menit, preparat dimasukkan ke dalam HE selama dua sampai lima menit. Preparat dicuci dengan menggunakan air mengalir sampai preparat berwarna biru. Diferensiasi dilakukan dengan pengamatan menggunakan mikroskop. Apabila belum cukup terwarnai maka kembalikan lagi preparat ke dalam larutan HE dan apabila terlalu tua maka preparat dimasukkan ke dalam pewarna regresif, yaitu alkohol 70 % yang mengandung 0,5 % HNO₃ sebanyak tiga sampai lima celupan.

Preparat dicuci kembali dengan air mengalir selama tiga sampai lima menit. Preparat dimasukkan ke dalam larutan *scoot* selama tiga menit. Lalu cuci kembali dengan air mengalir selama tiga sampai lima menit. Preparat dimasukkan kembali ke dalam alkohol seri dengan konsentrasi

70 % dan 96 % untuk beberapa kali celupan, kemudian dimasukkan ke dalam alkohol 100 % selama tiga menit. Dilanjutkan kembali pencelupan preparat ke dalam campuran alkohol 100 % dengan xylol selama dua sampai tiga menit. Sebelum xylol mengering, preparat ditutup dengan mengoles bahan mounting atau canada balsam untuk menutup *object glass*, kemudian ditutup dengan *cover glass* dan mencegah jangan sampai terbentuk gelembung-gelembung udara. Jaringan siap dilihat di bawah mikroskop.

5. Pengamatan

Preparat testis diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x, pengamatan meliputi sel-sel spermatogenik dari lapisan basalis ke arah lumen tubulus seminiferus.

Parameter yang diamati adalah :

- a. Jumlah sel-sel spermatogenik yaitu spermatogonia, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid, dan spermatozoa.
- b. Diameter tubulus seminiferus.

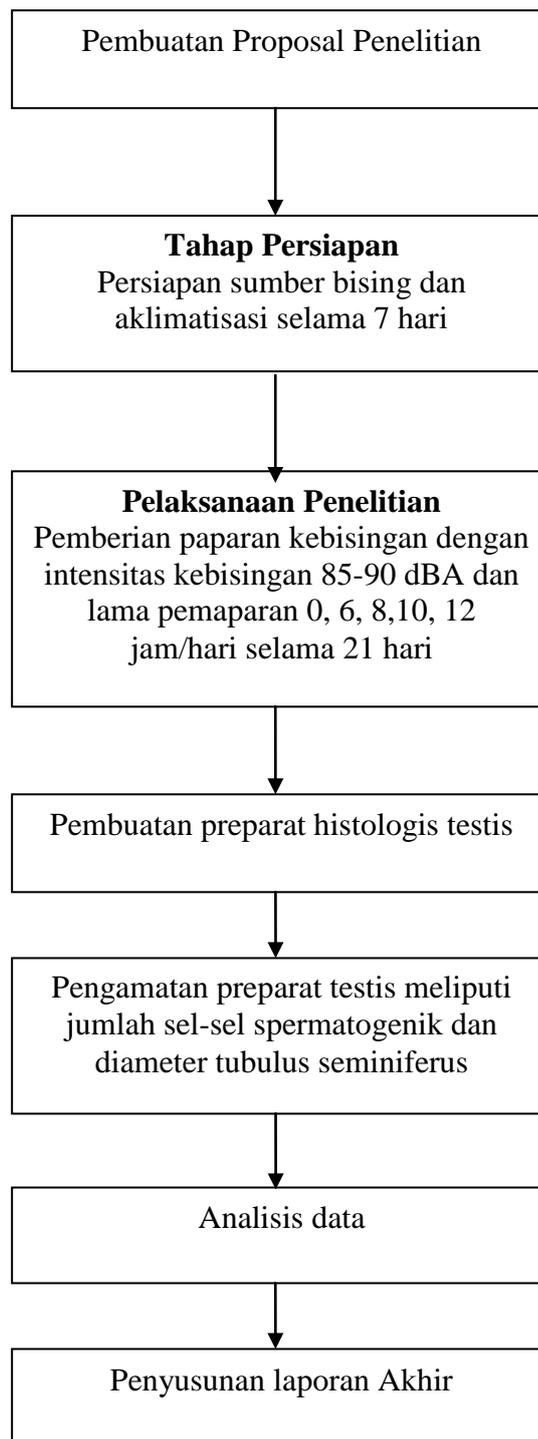
Penghitungan sel-sel spermatogenik dilakukan pada setiap tubulus seminiferus yang telah dipilih. Pengamatan dilakukan pada potongan melintang tubulus seminiferus yang diambil secara random.

Pengukuran diameter tubulus seminiferus dilakukan dengan menggunakan mikrometer pada lensa okuler. Pengukuran diameter tubulus seminiferus menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.

6. Analisis Data

Pada penelitian ini data dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar perlakuan. Apabila terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf 5 %.

E. Diagram Alir



Gambar 4. Diagram Alir Penelitian