

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi FMIPA Universitas Lampung dan pembuatan preparat histologi jantung dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran UNILA. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai November 2011.

B. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan uji eksperimental. Penelitian ini menggunakan 24 ekor mencit jantan dan 3 bulan dengan berat badan 30-40 gram. Desain yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pada saat perlakuan percobaan, mencit dibagi menjadi 4 kelompok yang setiap kelompoknya terdiri atas 6 ekor mencit betina.

Hal tersebut sesuai dengan rumus penentuan sampel Frederer (Sastrosupadi A, 2000) untuk uji eksperimental $t(n-1) > 15$. Nilai t pada rumus tersebut adalah jumlah perlakuan yang diberikan selama percobaan. Sedangkan nilai n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel dalam setiap kelompok perlakuan.

$$(t-1) (n-1) \geq 15$$

$$(4-1) (n-1) \geq 15$$

$$3 (n-1) \geq 15$$

$$(n-1) \geq 5$$

$$n \geq 6$$

1. Kriteria Inklusi

- a. Sehat
- b. Jenis kelamin jantan
- c. Berumur 3 bulan
- d. Memiliki berat badan antara 30 – 40 gram.

2. Kriteria Eksklusi

Penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif

C. Alat dan Bahan Penelitian

1. Hewan Percobaan

Pada percobaan menggunakan hewan mencit jantan (*Mus Musculus L*), sebanyak 24 ekor yang berumur 3 bulan dengan berat badan 30-40 gram. Sebelum diberikan 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 6

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 (7kV/m) sebagai kelompok perlakuan (P3). Hewan percobaan diperoleh dari (Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner) Regional II Bogor.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kadang 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, *embedding cassette, staining jar, refrigerator, stopwatch, water bath, cover glass, object glass* dan mikroskop.

3. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah organ tubuh mencit jantan, Alumunium 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.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Pemberian Perlakuan

Pelaksanaan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Lampung dengan menggunakan 24 ekor mencit jantan yang berumur 3 bulan dengan berat 30-40 gram. Mencit akan dikelompokkan menjadi 4 kelompok yang setiap kelompok terdiri dari 6 mencit. Sebanyak 24 mencit jantan dipelihara dalam kandang. Mencit percobaan ditempatkan kedalam kandang dilapisi bahan tembaga dengan ukuran 20 x 75 cm sebanyak 4 kandang. Masing-masing kandang disekat-sekat menjadi 5 bagian. Kedua lempengan tersebut dipasang vetrikel pada sebuah papan. Lempeng tembaga dihubungkan dengan transformator pengubah arus ac ke dc, perkembangan 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 jantungnya. Sebelum dilakukan pembedahan mencit terlebih dahulu dibius dengan kloroform, kemudian

setelah mencit tidak bergerak lagi mulailah dilakukan pembedahan pada bagian ventral tubuh mencit secara ventrikal. Spesimen dibuka perutnya dan diambil jantungnya. Jantung 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 jantung tersebut segera dibawa ke laboratorium Patologi Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung untuk dibuat preparat histologinya, sehingga jantung dapat diamati.

3. Pembuatan Preparat Histologis Organ Jantung

Prosedur pembuatan preparat histologi yang dilakukan terhadap organ jantung meliputi fiksasi, *trimming*, dehidrasi, *cleaning*, 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 jantung baik dari kelompok kontrol dan hewan yang terpajan medan listrik segera dimasukkan ke dalam larutan fiksasi (pengawet), Buffer formalin 10%. Perbandingan antara volume specimen dengan larutan 1 : 10 untuk mendapatkan hasil yang baik. Tujuan dilakukannya fiksasi yaitu untuk menghindari kemungkinan rusaknya organ sebelum dilakukan tahapan lainnya.

b. *Trimming*

Trimming yaitu suatu proses pemotongan organ secara tipis (4mm) 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. 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
Impregnasi	1 jam	Xylol III
	2 jam	Paraffin I
	2 jam	Paraffin II
	2 jam	Paraffin III
	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 58°C. Tuangkan paraplast cair ke dalam pans. Potongan organ satu persatu dipindahkan dari *embedding cassette* ke dasar pans dengan mengatur jarak yang 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 mengembang sempurna. Kemudian lembaran jaringan tersebut dipindahkan ke dalam *waterbath* selama beberapa detik sampai mengembang 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 37°C 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
Harris Hematoxylin	20 menit
Aquades	1 menit
Acid alkohol	2-3 celupan
Aquades	1 menit
Aquades	15 menit
Eosin	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. Pengamatan

Preparat hasil penelitian diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100x dan 400x. Pada hasil slide yang normal, akan terlihat inti sel berwarna biru dan berbentuk lonjong, sedangkan yang abnormal berbentuk kotak dan mengecil. Penglihatan preparat sebanyak 5x lapang pandang setiap masing- masing perlakuan.

E. Identifikasi Variabel

1. Variabel Independen

Variabel independen adalah paparan medan listrik tegangan tinggi.

2. Variabel Dependen

Variable dependen adalah inti sel yang abnormal pada ventrikel kanan jantung mencit.

F. Parameter yang Diamati

Pada penelitian ini parameter yang diamati adalah jumlah inti sel yang abnormal akibat hiperkontraksi pada ventrikel kanan jantung mencit jantan setelah pajanan medan listrik tegangan tinggi.

G. Analisis Data

Data yang diperoleh akan diolah secara statistik dengan menggunakan program SPSS 17.0 *for Windows*. Desain yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data dianalisis dengan menggunakan uji *one way* ANOVA untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar perlakuan. Sedangkan data hasil pemeriksaan histologi organ jantung mencit dianalisis secara deskriptif.

H. Diagram Alir Penelitian



