

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain studi eksperimental dengan hewan coba, sebagai bagian dari penelitian eksperimental lain yang lebih besar. Pada penelitian ini digunakan 2 variabel bebas (pemajanan medan elektromagnet dan generasi mencit) dengan variabel terikat jumlah folikel ovarium (folikel primer, sekunder, tersier, Graaf dan atresia).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Departemen Biologi FKUI, Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat sejak bulan Agustus 2008 hingga Juli 2009.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus L*) strain Swiss-Webster. Mencit diambil dari Departemen Biologi Fakultas Kedokteran UI yang telah dibiakan secara *inbreeding*.

3.3.1 Kriteria inklusi

- Mencit betina dewasa strain Swiss-Webster dengan umur kisaran 2-12 bulan.
- Mencit betina dewasa strain Swiss-Webster dengan berat badan 7-40 gram.

3.3.2 Besar Pengulangan

Besar pengulangan pada penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan **rumus Federer**, yaitu:

$(n-1)(t-1) < 15$, di mana:

n = besar pengulangan

t = jumlah kelompok

Pada penelitian ini terdapat 6 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 3 generasi. Maka besar pengulangan per kelompok minimal 4 ekor mencit.

3.4 Metode Pengambilan Hewan Coba

Enam pasang mencit parental (jantan dan betina) diambil dari stok mencit yang dikembangkan secara *inbreeding* di Departemen Biologi Kedokteran FKUI secara *convenient sampling*. Mencit-mencit tersebut kemudian dialokasikan ke dalam kelompok kontrol dan perlakuan. Mencit generasi pertama didapatkan dari keturunan mencit parental. Mencit generasi kedua didapatkan dari keturunan hasil perkawinan mencit generasi pertama. Mencit generasi ketiga didapatkan dari keturunan hasil perkawinan mencit generasi kedua. Empat ekor mencit dari tiap kelompok di masing-masing generasi dipilih berdasarkan metode *convenient sampling* untuk dijadikan sampel.

3.5 Etik Pemeliharaan Hewan Coba

- Kandang hewan terbuat dari plastik berukuran 20cm x 30 cm x15 cm.
- Tutup kandang terbuat dari anyaman kawat kasa berukuran 30.5cm x 20.5cm x 3.5 cm dengan luas anyaman 0.5 cm²
- Dasar kandang dialasi dengan serbuk gergaji kayu yang cukup tebal agar urin terserap baik dan selalu kering untuk menghindari rembesan urin ke lempeng aluminium.
- Kandang mencit dibersihkan secara rutin agar kenyamanan mencit terjaga.
- Pada penutup kandang diletakan botol berisi air dari sumur artesis.
- Minuman diberikan berlebihan dari botol melalui pipet khusus dari kaca.
- Pencahayaan diberikan 12 jam gelap dan 12 terang dengan kandang transparan.
- Kandang mencit berada dalam ruangan bersuhu 22°C
- Makanan dan minuman diberikan secukupnya (*ad libitum*). Makanan diberikan dalam bentuk pelet kecil.
- Mencit diaklimatisasi selama 1 minggu sebelum digunakan.
- Mencit diperlakukan *gentle be gentle*.

- Pada saat akan dikorbankan (*sacrificed*), mencit diberi eter dan dijaga agar tidak menyakiti hewan tersebut, kemudian ovarium mencit diambil.

3.6 Cara Memperoleh F1 – F3

1. Mencit parental (P) untuk kelompok perlakuan dan kontrol diambil berdasarkan metode pengambilan hewan coba yang telah dijelaskan sebelumnya.
2. Mencit P dikawinkan dengan P dari kelompok yang sama (perlakuan-perlakuan; kontrol-kontrol) dan dari anak yang dilahirkan, diambil mencit yang dijadikan hewan coba generasi F1.
3. Hewan coba generasi F1 dikawinkan dengan sesama generasi, dan dari anak yang dilahirkan diambil mencit yang dijadikan hewan coba generasi F2.
4. Demikian seterusnya hingga F3.

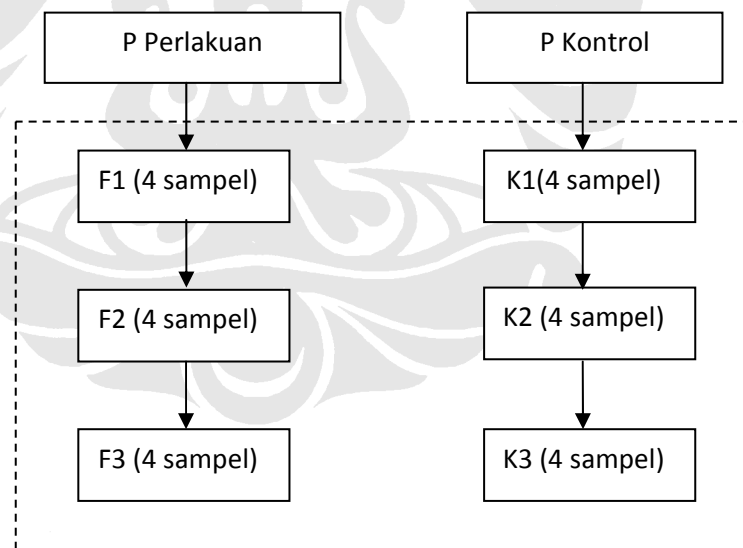


Diagram 3.1 Bagan Pemilihan Hewan Coba

Keterangan:

- P = Parental. Generasi parental untuk kelompok perlakuan digunakan 4 pasang mencit dan untuk kelompok kontrol sebanyak 2 pasang mencit.

- F1 = Generasi pertama yang merupakan keturunan P perlakuan. F2 = generasi kedua yang merupakan keturunan F1 perlakuan. F3 = generasi ketiga yang merupakan keturunan F2 perlakuan.
- K1 = Generasi pertama yang merupakan keturunan P kontrol. K2 = generasi kedua yang merupakan keturunan K1. K3 = generasi ketiga yang merupakan keturunan K2.
- Dari generasi F1, dipilih 4 ekor mencit sebagai hewan coba untuk dilakukan pengukuran. Dari sisanya dipilih lagi 4 pasang untuk dikawinkan dan memperanakan generasi F2. Demikian seterusnya hingga F3.
- [] = Merupakan kelompok yang ikut dalam penelitian.
- Metode pengambilan hewan coba yang diterapkan pada pemilihan parental dan hewan coba penelitian menggunakan *convenient sampling*.

3.7 Cara Pemajanan Mencit

Pemajanan terhadap mencit dilakukan secara kontinu. Setiap mencit dari F1, F2, dan F3 mendapat pemajanan mulai dari masa embrional hingga 2 bulan setelah menghasilkan keturunan (usia mencit kira-kira 4-5 bulan).

Teknik pemajanan adalah sebagai berikut:

1. Terdapat dua kelompok mencit dalam percobaan, yaitu satu kelompok kontrol dan satu kelompok perlakuan. Pemajanan dilakukan hanya terhadap kelompok perlakuan.
2. Setiap kelompok mencit dimasukkan ke dalam beberapa kandang plastik. Kedua kandang berada di ruangan yang sama.
3. Kandang kelompok perlakuan diletakkan di antara dua lempengan aluminium yang dihubungkan dengan pembangkit listrik bertegangan 3 kV/10cm dengan frekuensi 50 Hz secara kontinu (lihat gambar 3.2).
4. Kandang kelompok kontrol berada sejauh 3 m dari kandang kelompok perlakuan sehingga tidak terkena pemajanan medan elektromagnet.

3.8 Cara Kerja

3.8.1 Bahan Penelitian

1. Kapas alkohol
2. Aquadest/bidest
3. Eter
4. Larutan fikasasi Bouin (15 bagian asam pikrat jenuh dalam air ditambah 5 bagian formaldehide 40% dan 1 bagian asam asetat glasial)
5. Larutan hematoksilin eosin (HE)
6. Alkohol serial (70%, 80%, 95%, dan 100%)
7. Benzil benzoat, benzol
8. Parafin padat
9. Albumin
10. Xylol
11. Entelan

3.8.2 Alat Penelitian

1. Seperangkat pembangkit listrik tegangan tinggi (*power supply*)



Keterangan gambar : 1. Kandang mencit 2. Lempeng aluminium sebagai elektroda positif 3. Lempeng aluminium sebagai elektroda negatif 4. *Power supply*

Gambar 3.2. Peralatan Pembangkit Listrik Tegangan Tinggi yang Digunakan untuk Memajankan Medan Elektromagnet Terhadap Mencit dalam Penelitian Ini

2. Stoples dan penutupnya
3. Peralatan bedah mencit: gunting, pinset, skapel, dll.
4. Kandang mencit
5. Mikrotom
6. Kaca preparat
7. Cover glass
8. *Staining-jar* (bak pewarna)
9. Mikroskop cahaya binokuler

3.8.3 Pengambilan Sampel

Dari mencit-mencit yang telah menerima pemajanan maupun yang tidak menerima pemajanan diambil sampel yang diperlukan. Mencit diambil dari kandang dan ditaruh di wadah berisi kapas yang sudah diberikan eter hingga mencit pingsan. Setelah pingsan, ovarium mencit dapat diambil. Ovarium mencit dimasukkan ke dalam cairan fiksatif Bouin untuk selanjutnya dibuat sediaan mikroskopik.

3.9.4 Cara Pembuatan Sediaan Histologi Ovarium

a. Fiksasi

Ovarium kiri dan kanan direndam dalam cairan Bouin di dua tempat yang terpisah selama 24 jam.¹⁷

b. Dehidrasi

Ovarium yang telah difiksasi dengan cairan Bouin selama 24 jam, kemudian didehidrasi dengan serial alkohol dari konsentrasi rendah sampai konsentrasi tinggi sebagai berikut:¹⁷

1. Alkohol 70% 2 tahap, masing-masing 30 menit
2. Alkohol 80% 2 tahap, masing-masing 30 menit
3. Alkohol 95% 2 tahap, masing-masing 30 menit
4. Alkohol 100% 2 tahap, masing-masing 30 menit

c. Penjernihan

Setelah dehidrasi dengan serial alkohol, untuk menghilangkan alkohol tersebut dilakukan penjernihan (*clearing*) dengan cara direndam dalam Benzil benzoat I selama 24 jam sampai tenggelam, Benzil Benzoat II selama 1 jam kemudian dimasukkan ke dalam Benzol 2 kali ganti, masing-masing 1 jam.¹⁷

d. Infiltrasi parafin

Ovarium yang telah dihilangkan alkoholnya dimasukkan ke dalam cetakan parafin cair dengan titik didih 56°-58°C. Proses infiltrasi parafin dilakukan di dalam inkubator, ovarium direndam dalam parafin cair I selama 1 jam dan parafin cair II selama 2 jam.¹⁷

e. Pengirisan

Cetakan parafin yang berisi ovarium dalam kotak-kotak kertas kecil berukuran 1cmx1cmx2cm dibiarkan mengeras. Kemudian direkatkan pada potongan kayu kecil. Pegangan kayu dengan cetakan parafin yang berisi ovarium dipasang pada mikrotom, kemudian diiris setebal 5 mikron dengan arah melintang. Irisan ovarium yang akan dipakai dalam penelitian diambil.¹⁷

f. Perekatan dan Deparafinasi

Preparat yang telah diiris setebal 5 mikron direkatkan pada gelas objek dengan menggunakan protein putih telur dan gliserin. Kemudian dihilangkan parafinnya dengan menggunakan xylol sebanyak 2 kali penggantian masing-masing 5 menit.¹⁷

g. Rehidrasi

Pada proses rehidrasi, preparat dimasukkan ke dalam serial alkohol dari konsentrasi tinggi sampai rendah, dengan tahapan sebagai berikut:¹⁷

1. Alkohol 100% 2 tahap, masing-masing 5 menit
2. Alkohol 95% 2 tahap, masing-masing 5 menit
3. Alkohol 80% 2 tahap, masing-masing 5 menit
4. Alkohol 70% 2 tahap, masing-masing 5 menit

h. Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)

Setelah rehidrasi, preparat diberi pewarna HE dengan menggunakan metode Harris, melalui tahapan sebagai berikut:¹⁷

1. Harris hematoksilin selama 15 menit (*)
2. Cuci dengan air kran
3. Celup dengan alkohol 70% selama 10 detik
4. Cuci dengan air kran
5. Celup dengan amonia
6. Cuci dengan air kran selam 10-20 menit
7. Eosin selama 15 detik-2 menit
8. Dehidrasi
9. Alkohol absolut I selama 2 menit
10. Alkohol absolut II selama 3 menit
11. Xylol selama 2 menit
12. Tutup dengan entelan
13. Dilihat dengan mikroskop cahaya hasilnya:
 - Nukleus berwarna biru dengan metakromasi
 - Sitoplasma berwarna merah muda.

(*) Cara membuat Solutio Harris Hematoksilin

Kristal hematoksilin 5 gram ditambah alkohol absolut 50 ml, kemudian dicampur dengan 100 gram amonium dalam 1000 ml akuades. Kedua campuran tersebut dihangatkan, ditambahkan 2,5 ml merkuri oksida. Selanjutnya kepada setiap 100 ml larutan tersebut ditambahkan asam asetat glasial sebanyak 2-4 ml kemudian disaring.¹⁷

3.10 Analisis Data

Pada penelitian terhadap jumlah ovarium mencit, data folikel ovarium mencit diperoleh dengan melihat sediaan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x untuk menghitung jumlah folikel primer, sekunder, tersier, de Graaf, dan atresia (primer, sekunder dan tersier). Data yang diperoleh dari hasil pengamatan diuji normalitasnya dengan menggunakan metode Shapiro-Wilk. Bila uji tersebut dipenuhi, maka populasi data mempunyai distribusi normal. Apabila tidak terpenuhi kenormalannya maka dilakukan transformasi $\sqrt{(x+1/2)}$ pada data tersebut.

Untuk menganalisa data antara kontrol dengan perlakuan digunakan uji t tidak berpasangan bila distribusi data normal, atau dengan uji Mann-Whitney bila distribusi data tetap tidak normal setelah dilakukan transformasi. Sedangkan untuk menganalisa data antara generasi kelompok perlakuan (F1,F2, dan F3) dilakukan uji Anova satu arah. Jika dengan uji tersebut terdapat perbedaan yang bermakna kemudian dilakukan uji beda nyata terkecil / *least significant difference* (LSD) dengan derajat kemaknaan 0,05. Bila distribusi data tetap tidak normal setelah dilakukan transformasi, data dianalisis dengan Kruskal Wallis. Jika dengan uji tersebut terdapat perbedaan yang bermakna kemudian dilakukan analisis *post hoc* dengan bantuan uji Mann-Whitney.

