

## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2016 sampai dengan bulan Februari 2017, bertempat di Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

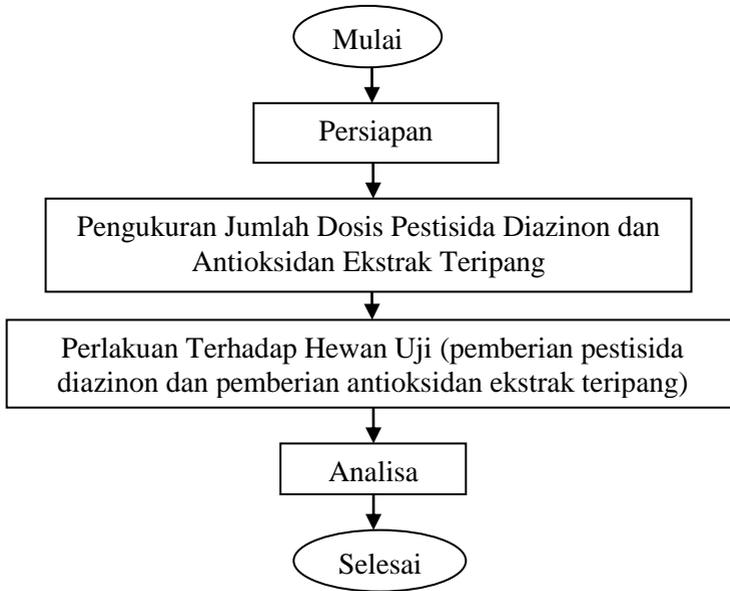
### **3.2 Alat dan Bahan**

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu box plastik sebagai kandang mencit, sonde lambung, masker, pipet tetes, sarung tangan, seperangkat alat bedah dan mikroskop.

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu mencit jantan sebanyak 55 ekor dengan kisaran berat badan 20-30 gram, insektisida diazinon, ekstrak teripang yang telah dijual dipasaran, pakan mencit berupa pellet, air mineral untuk minum mencit, sekam kayu sebagai alas tidur mencit, aquades, formalin dan alkohol.

### **3.3 Tahap Penelitian**

Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap. Tahap pertama dilakukan untuk mengetahui kerusakan organ limpa dari mencit akibat pemberian pestisida diazinon dengan lima variasi dosis. Setelah diketahui dosis pestisida yang efektif merusak organ maka dilakukan penelitian untuk tahap kedua. Pada tahap kedua, penelitian dilakukan untuk mengetahui perbaikan kerusakan organ limpa mencit yang diakibatkan dari pemberian pestisida diazinon dengan dosis efektif pada tahap pertama. Pada tahap kedua mencit diberikan antioksidan ekstrak teripang dengan lima variasi dosis. Berikut diagram alir dari tahapan penelitian yang akan dilakukan terdapat pada Gambar 3.1:



**Gambar 3.1** Diagram alir perlakuan

### 3.3.1 Persiapan Sampel

#### a. Persiapan Hewan Coba Mencit

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 55 ekor. Mencit dimasukkan ke dalam kandang yang sudah tersedia pakan mencit berupa pellet, tempat makan, tempat minum beserta sekam sebagai alas tidur. Kemudian dilakukan tahap aklimatisasi selama 10 hari di laboratorium. Tahap aklimatisasi ini untuk menyesuaikan kondisi mencit terhadap lingkungan sekitarnya sebelum diberikan perlakuan. Selanjutnya mencit dibagi menjadi 3 kelompok dengan masing-masing perlakuan yaitu:

1. **Kontrol negatif (K<sup>-</sup>)** : mencit tidak diberi diazinon dan tidak diberi antioksidan
2. **Diazinon negatif (D<sup>-</sup>)** : mencit diberi diazinon dan tidak diberi antioksidan
3. **Diazinon positif (D<sup>+</sup>)** : mencit diberi diazinon dan diberi antioksidan

**Tabel 3.1** Pengelompokan mencit berdasarkan perlakuan

Tahap	Kelompok	Perlakuan	
		Pemberian Diazinon	Ekstrak Teripang
<b>I</b>	<b>Kontrol Negatif (K-)</b>	-	-
	<b>Diazinon Negatif (D-)</b>	+	-
<b>II</b>	<b>Diazinon Positif (D+)</b>	+	+

**Tabel 3.2** Variasi dosis pestisida diazinon dan ekstrak teripang

<b>Kontrol Negatif (K-)</b>	Tanpa pemberian pestisida diazinon dan antioksidan ekstrak teripang	
<b>Diazinon Negatif (D-)</b>	1	Pemberian pestisida diazinon dengan dosis 50 mg/1 L aquades
	2	Pemberian pestisida diazinon dengan dosis 75 mg/1 L aquades
	3	Pemberian pestisida diazinon dengan dosis 100 mg/1 L aquades
	4	Pemberian pestisida diazinon dengan dosis 125 mg/1L aquades
	5	Pemberian pestisida diazinon dengan dosis 150 mg/1L aquades
<b>Diazinon Positif (D+)</b>	1	Pemberian pestisida diazinon dengan dosis 125 mg/1 L aquades dan pemberian ekstrak teripang 0,01714 ml/kg BB
	2	Pemberian pestisida diazinon dengan dosis 125 mg/1L aquades dan pemberian ekstrak teripang 0,03428 ml/kg BB
	3	Pemberian pestisida diazinon dengan dosis 125 mg/1L aquades dan pemberian ekstrak teripang 0,051428 ml/kg BB
	4	Pemberian pestisida diazinon dengan dosis 125 mg/1L aquades dan pemberian ekstrak teripang 0,068571 ml/kg BB
	5	Pemberian pestisida diazinon dengan dosis 125 mg/1L aquades dan pemberian ekstrak teripang 0,08571 ml/kg BB

Di dalam satu kandang terdapat 5 ekor mencit untuk masing-masing perlakuan. Pada kelompok (K-) mencit tidak diberi pestisida diazinon maupun antioksidan ekstrak teripang. Pada kelompok (D-) digunakan variasi dosis pestisida diazinon yang diberikan secara oral selama dua minggu pada mencit. Pada kelompok (D+) digunakan dosis pestisida diazinon yang paling efektif merusak organ yaitu 125 mg/1 L aquades serta pemberian antioksidan ekstrak teripang dengan lima variasi dosis. Adapun variasi dosis pestisida diazinon dan dosis antioksidan ekstrak teripang yang diberikan pada mencit tertera pada Tabel 3.2.

### **b. Pestisida yang digunakan**

Pestisida yang digunakan dalam penelitian ini adalah pestisida dengan jenis insektisida diazinon yang dijual dipasaran. Diazinon ini berupa cairan pekat yang mengandung bahan aktif 600 g/l.

### **c. Persiapan Ekstrak Teripang**

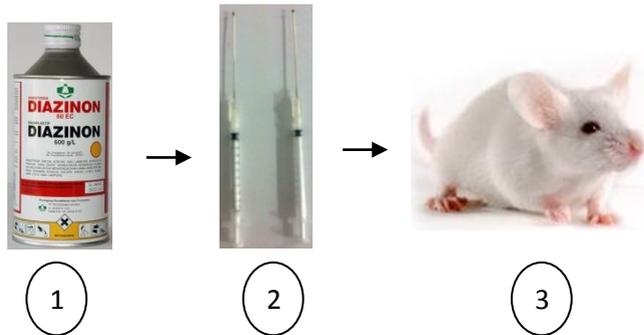
Ekstrak teripang yang diberikan kepada mencit berupa cairan yang sudah dijual dipasaran. Ekstrak teripang diberikan pada mencit selama dua minggu dengan cara dicekikkan ke mencit menggunakan sonde lambung. Dosis ekstrak teripang yang diberikan pada mencit disesuaikan dengan berat badan mencit.



**Gambar 3.2** Pemberian ekstrak teripang

### 3.3.2 Persiapan Alat

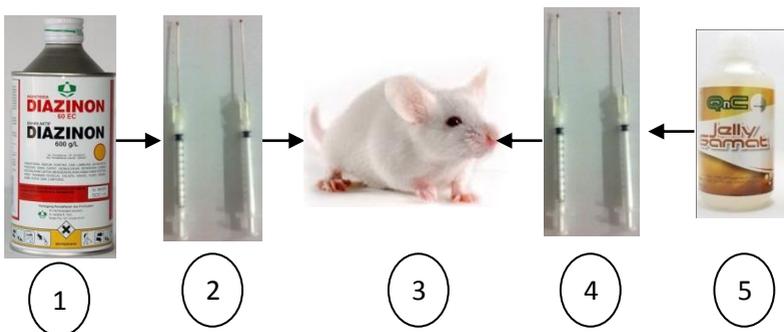
Rangkaian alat pada penelitian ini yaitu dimulai dari membuat cairan diazinon dengan dosis 50 mg/1L aquades, 75 mg/1L aquades, 100 mg/1L aquades, 125 mg/1L aquades dan 150 mg/1L aquades. Kemudian diazinon tersebut dimasukkan ke dalam tubuh mencit dengan menggunakan sonde lambung. Antioksidan ekstrak teripang juga diberikan menggunakan sonde lambung. Dosis antioksidan yang diberikan yaitu 0,02 ml/kg BB, 0,03 ml/kg BB, 0,05 ml/kg BB, 0,07 ml/kg BB dan 0,09 ml/kg BB.



**Gambar 3.3** Rangkaian alat kelompok diazinon negatif (D-)

Keterangan:

1. Diazinon
2. Sonde lambung
3. Mencit



**Gambar 3.4** Rangkaian alat kelompok diazinon positif (D+)

Keterangan:

1. Diazinon
2. Sonde lambung
3. Mencit
4. Sonde lambung
5. Antioksidan

### **3.3.3 Pembuatan Preparat**

- a. Mencit dibius dengan menggunakan kloroform dalam botol anestesi sampai pingsan.
- b. Setelah mencit pingsan dilakukan pembedahan secara vertikal dan diambil organ limpanya dan dipotong sekecil mungkin tetapi mewakili struktur keseluruhan jaringan.
- c. Kemudian difiksasi dengan cara direndam dalam formalin 10% selama lebih dari 24 jam.
- d. Setelah preparat siap, selanjutnya dimasukkan kedalam larutan etanol secara bertingkat etanol 70%, 80%, 90%, 95% dan 96% selama 30 menit. Khusus untuk etanol 95% dan 96% dilakukan 2 kali perendaman.
- e. Preparat kemudian dimasukkan ke dalam xylol selama 3 x 30 menit.
- f. Kemudian preparat dipindahkan ke dalam paraffin cair dalam blok preparat.
- g. Setelah dicetak, preparat dipotong dan ditempelkan pada objek gelas yang telah diberi entelan dan dipanaskan dengan suhu 2-5°C dibawah titik lebur paraffin (sekitar 40°C) sampai kering.
- h. Setelah kering dimasukkan ke dalam xylol murni selama 5-10 menit.
- i. Ambil preparat dan masukkan ke dalam larutan etanol berturut-turut 96%, 95%, 90%, 80% dan 70% selama 5-10 menit.
- j. Dicuci dengan air kemudian mewarnai hemaktosilin-eosin selama 1-2 menit.
- k. Bilas dengan air, kemudian dikeringkan pada suhu kamar dan ditutup dengan obyek gelas.
- l. Setelah itu diamati di mikroskop dengan pembesaran 1000 kali.

### 3.3.4 Perhitungan Dosis Pestisida Diazinon

Dosis penggunaan pestisida diazinon sebanyak 75 mg/1L aquades. Berikut dosis bertingkat yang akan digunakan dalam penelitian ini:

Dosis 1: 50 mg diazinon/1 liter aquades

Dosis 2: 75 mg diazinon /1 liter aquades

Dosis 3: 100 mg diazinon /1 liter aquades

Dosis 4: 125 mg diazinon /1 liter aquades

Dosis 5: 150 mg diazinon /1 liter aquades

### 3.3.5 Perhitungan Dosis Ekstrak Teripang

Dosis ekstrak teripang perhari untuk manusia yaitu tiga sendok makan tiga kali dalam sehari. Pada penelitian ini dosis dikonversi terlebih dahulu sesuai dengan berat badan mencit. Maka setelah dikonversi ke dosis mencit adalah:

Dosis Ekstrak Teripang:

$$(20\text{ml} \times 3 \text{ kali}) \times \frac{0,02 \text{ kg}}{70 \text{ kg}} = 0,01714 \text{ ml/kg BB} \dots\dots\dots 3.1$$

Maka didapatkan dosis bertingkat ekstrak teripang yaitu:

Dosis 1 = 0,01714 ml/kg BB

Dosis 2 = 0,03428 ml/kg BB

Dosis 3 = 0,051428 ml/kg BB

Dosis 4 = 0,068571 ml/kg BB

Dosis 5 = 0,08571 ml/kg BB

Dalam 500 ml mengandung 125 g ekstrak teripang.

## 3.4 Analisa Data

### 3.4.1 Cara Membaca Data Dari Preparat

Preparat yang telah dibuat diletakkan di atas meja mikroskop. Kemudian mikroskop diatur sehingga objek pada preparat terlihat jelas. Setelah didapatkan objek dengan bidang pandang yang jelas, diamati dengan perbesaran 1000 kali. Kemudian dilakukan

pengambilan gambar dan dilakukan analisis terhadap objek yaitu antara lain:

- a. Luas sampel (mm x mm)
- b. Kerusakan sel dengan melihat bentuk sel
- c. Bentuk sel yang sehat

Setelah menganalisis sel pada bagian tersebut, maka mikroskop digeser pada bagian lain yaitu bagian atas, bawah, kanan, kiri dan tengah untuk melihat kerusakan sel yang lain.

### 3.4.2 Perhitungan Persentase Kerusakan dan Perbaikan Sel

Data yang didapatkan dari penelitian ini kemudian diolah dengan menggunakan *microsoft office excel* untuk dapat dianalisis. Perhitungan persentase kerusakan dan perbaikan sel limpa menggunakan persamaan 3.2 dan 3.3. Berdasarkan perhitungan dengan persamaan 3.2 dan 3.3 tersebut maka dapat digunakan untuk menentukan grafik.

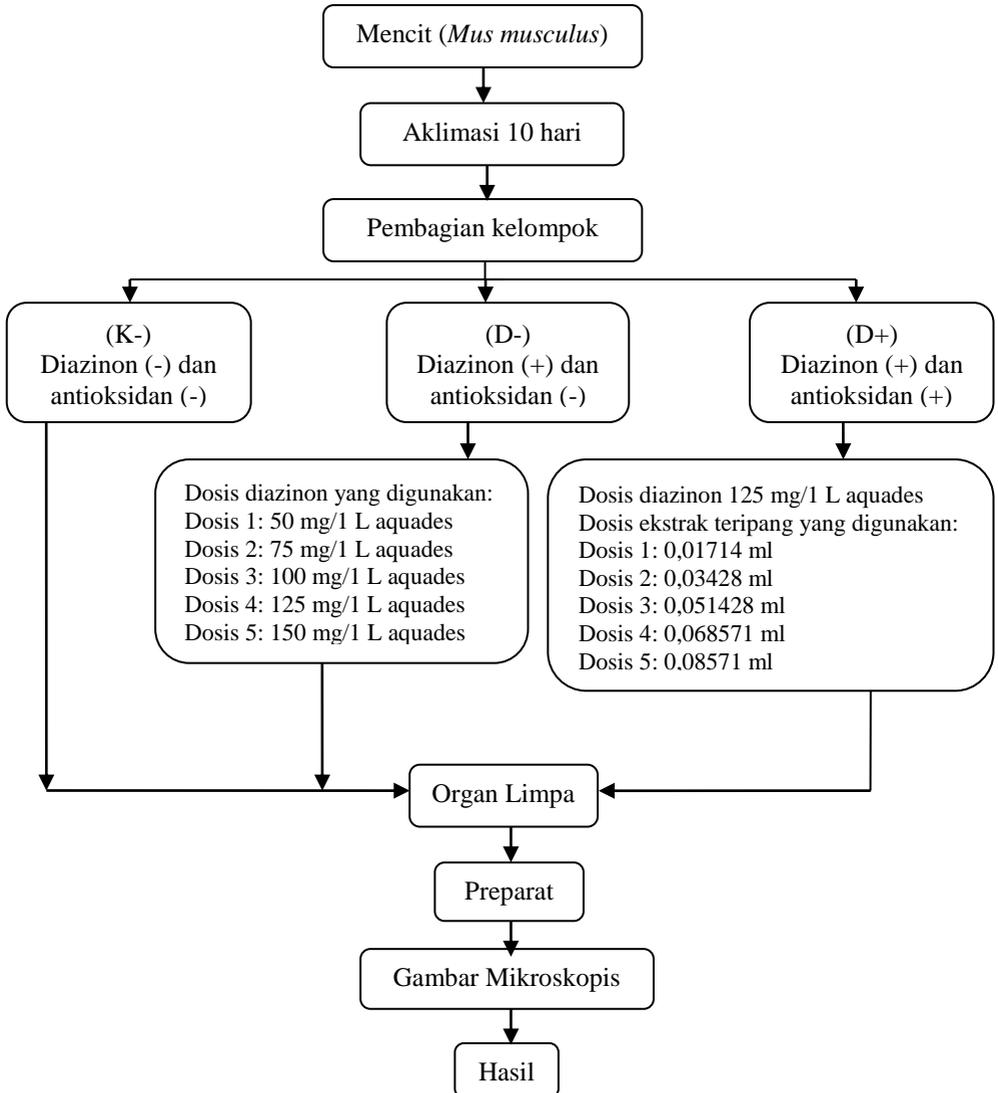
$$\% \text{ kerusakan sel} = \frac{\Sigma \text{ sel rusak}}{\Sigma \text{ sel dalam 1 lapang pandang}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots 3.2$$

$$\% \text{ perbaikan sel} = \frac{\Sigma \text{ sel baik}}{\Sigma \text{ sel dalam 1 lapang pandang}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots 3.3$$

Data yang diperoleh kemudian diplot menjadi grafik dan diamati pola yang dihasilkan dari grafik tersebut. Pola yang dihasilkan dari grafik akan menunjukkan hubungan dari parameter yang bersangkutan. Pada penelitian ini parameternya adalah dosis pestisida diazinon, kerusakan organ dan dosis antioksidan ekstrak teripang. Pada grafik dapat diketahui hubungan dosis pestisida diazinon dengan kerusakan limpa serta hubungan dosis antioksidan ekstrak teripang dengan kerusakan organ limpa.

### 3.5 Kerangka Kerja

Gambar dibawah ini merupakan diagram alir dari penelitian.



**Gambar 3.5** Diagram alir penelitian

(Halaman ini sengaja dikosongkan)