

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung untuk pemeliharaan mencit dan pembuatan sediaan uji. Sedangkan pembedahan mencit, proses pembuatan dan pengamatan histologi dilakukan di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III, Bandar Lampung. Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2014 sampai dengan bulan Februari 2015.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 unit kandang mencit berukuran 40x20x15 cm yang terbuat dari plastik yang ditutup dengan ring kawat, tempat minuman dan makanan mencit, beaker glass, dan erlenmeyer yang digunakan untuk membuat sediaan uji senyawa taurin, timbangan analitik untuk menimbang senyawa taurin, benzo()piren, dan berat tubuh mencit, jarum suntik untuk menyuntikkan benzo()piren pada mencit, sonde lambung untuk mencekokkan taurin pada mencit, gelas objek untuk menempatkan sayatan paru, *cover glass* yang digunakan untuk menutup sayatan agar tidak mudah rusak atau hilang, blok kayu sebagai media penempatan blok parafin

yang telah berisi organ paru, kertas tisu, mikrotom untuk menyayat organ paru di dalam parafin, perangkat bedah untuk membedah dan mengambil organ paru mencit, mikroskop digunakan untuk pengamatan preparat paru yang sudah jadi, dan kamera untuk mengambil gambar penelitian.

Bahan yang digunakan adalah mencit DDY jantan (*Mus musculus*) yang berumur 5-7 minggu dengan berat tubuh ± 30 g, mencit diperoleh dari bagian Non Ruminansia dan Satwa Harapan, Institut Pertanian Bogor (IPB), Jawa Barat, air untuk minuman mencit dan pelarut taurin, senyawa taurin, benzo()piren (SIGMA), minyak jagung sebagai pelarut benzo()piren, larutan fisiologis HCl 0.01 % yang digunakan untuk proses fiksasi, klorofom untuk membius mencit sebelum dibedah, *xylol* untuk membeningkan warna sayatan, parafin keras, *Hematoxilin Eosin* untuk mewarnai jaringan, alkohol bertingkat untuk proses dehidrasi, canada balsam, dan NaCl 0.9 %.

C. Rancangan Percobaan

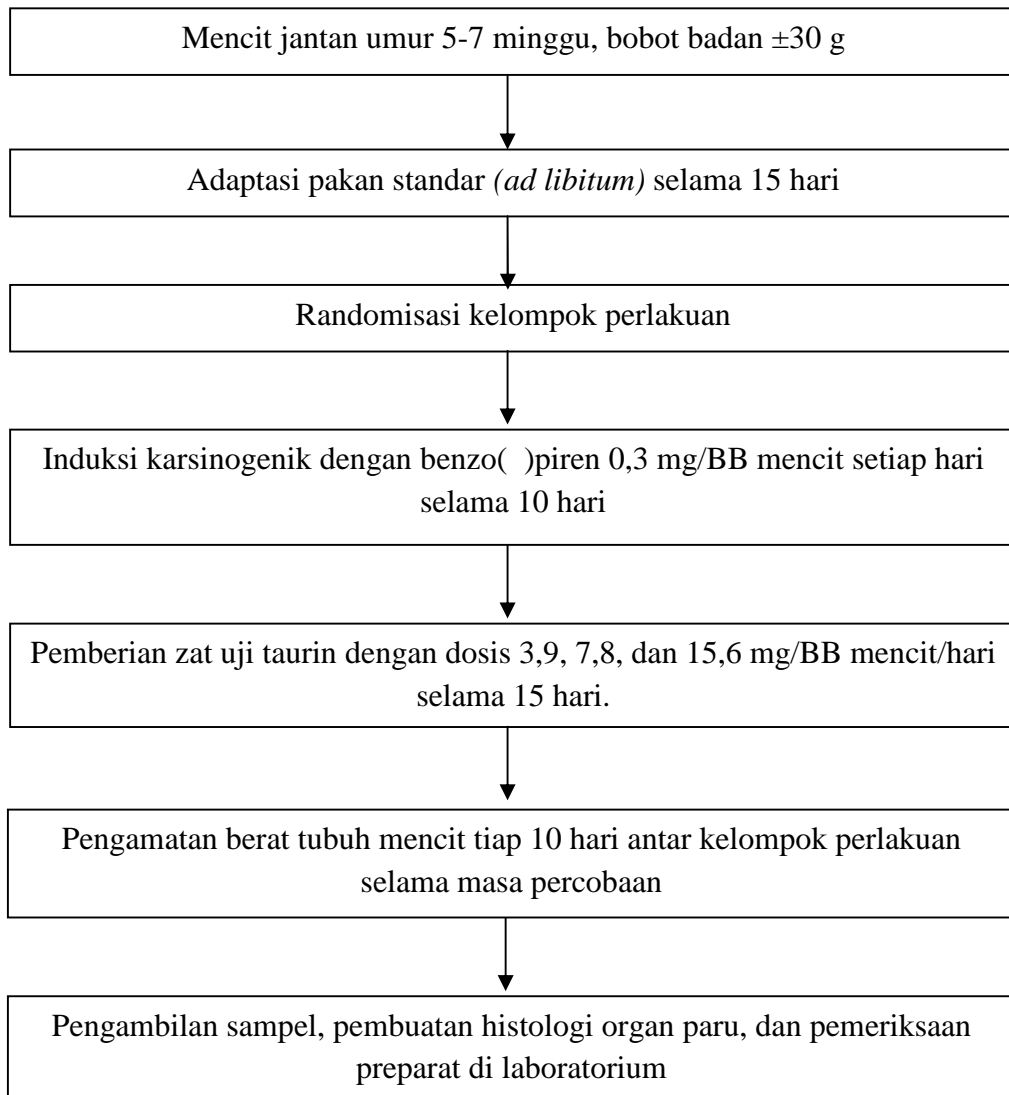
Penelitian dilaksanakan dalam rancangan acak lengkap. Pengujian pada mencit dilakukan secara *in vivo*. Mencit dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, masing-masing perlakuan terdiri dari 5 ekor sebagai ulangan. Kelompok I (diberi 0,2 ml minyak jagung dan diberi air minum sampai akhir masa penelitian), II (diinduksi dengan benzo()piren tanpa pemberian bahan uji), III (sebelum diinduksi benzo()piren, diberi dosis taurin 7,8 mg/BB mencit/hari selama dua minggu), IV (setelah diinduksi benzo()piren, diberi taurin dosis 3,9 mg/BB mencit/hari), V (setelah diinduksi benzo()piren, diberi taurin dosis

7,8 mg/BB mencit/hari), VI (setelah diinduksi benzo()piren, diberi taurin dosis 15,6 mg/BB mencit/hari).

D. Parameter

Parameter dalam penelitian ini adalah histologi dari organ paru-paru, berat tubuh dan berat basah paru mencit (*Mus musculus*) yang telah diinduksi benzo()piren.

E. Alur Penelitian



Gambar 7. Skema Penelitian

F. Pelaksanaan

1. Pembuatan Sediaan Uji

Sediaan senyawa taurin dibuat berdasarkan literatur dari Shao and Hathcock (2008), yaitu 3 g/70 kg berat tubuh pada manusia. Dosis taurin pada mencit dihitung dengan menggunakan tabel konversi manusia ke

mencit menurut Nugraha (2011). Nilai konversi dari manusia ke mencit adalah 0,0026. Sehingga diperoleh dosis senyawa taurin untuk mencit, yaitu $3000 \text{ mg} \times 0,0026 = 7,8 \text{ mg/bb/hari}$. Dosis yang digunakan untuk sediaan uji adalah 3,9, 7,8, dan 15,6 mg/bb/hari.

2. Pemeliharaan Mencit (*Mus musculus*)

Mencit diaklimasi selama 15 hari diberi makanan dan minuman yang sama secara teratur. Pada tahap ini dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum dan berat tubuh mencit. Mencit yang sakit tidak diikutsertakan dalam percobaan. Mencit ditempatkan pada lingkungan kandang dengan ventilasi yang cukup serta penyinaran yang cukup dimana lamanya terang 14 jam dan lama gelap 10 jam.

3. Makanan dan Minuman Mencit (*Mus musculus*)

Makanan mencit berupa pakan pelet yaitu *comfeed BR II* . yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Bahan dan Komposisi Pakan Mencit

| BAHAN DASAR PAKAN MENCIT |
|--------------------------|
| Jagung |
| Bekatul |
| Bungkil kedelai |
| Tepung Daging |
| Garam |
| Vitamin |
| Mineral |

| ANALISIS PROKSIMAT PAKAN MENCIT | PRESENTASE SETIAP 100 GRAM |
|---------------------------------|----------------------------|
| KADAR AIR | MAX 12,0% |
| PROTEIN KASAR | MIN 19,0%-21,0% |
| LEMAK KASAR | MIN 5,05% |
| SERAT KASAR | MAX 5,0% |
| ABU | MX 7,0% |
| CALSIUM | MIN 0,9% |
| PHOSPOR | MIN 0,6%-0,9% |
| COCCIDIOSTAT | - |
| ANTIBIOTIKA | - |

Minuman mencit berupa air mineral yang diberikan melalui botol gelas minuman. Makanan dan minuman mencit diberikan secara *ad libitum* (sampai kenyang).

4. Induksi Karsinogenik terhadap Hewan Uji dengan Benzo()piren

Induksi karsinogenik dilakukan dengan cara menyuntikkan larutan

benzo()piren pada jaringan subkutan mencit di bagian tengkuk..

Benzo()piren 0,3 mg dilarutkan dalam 0,2 ml minyak jagung. Semua

kelompok diinduksi dengan benzo()piren selama 10 hari kemudian

dilanjutkan dengan pemberian zat uji selama 15 hari (Sugitha dan Djalil, 1989).

Kemudian ditunggu sampai adanya kanker, yaitu munculnya benjolan (nodul) di bagian tengkuk. Benzo()piren diberikan selama 10 hari karena sel kanker akan tumbuh setelah terinduksi antara 9-13 hari. Pada periode ini terlihat dan terasa perubahan pada tengkuk dan kaki mencit (Gustanti, 1999). Untuk kontrol, mencit tidak diinjeksi benzo()piren namun diinjeksi dengan pelarut benzo()piren, yaitu 0,2 ml minyak jagung.

5. Pemberian Senyawa Uji Taurin

Pemberian senyawa taurin diberikan pada mencit yang telah diinduksi benzo()piren. Pemberian zat uji taurin diberikan setiap hari secara oral selama 15 hari setelah munculnya benjolan (nodul) di bagian tengkuk mencit. Perlakuan terhadap hewan uji dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Dosis pada tiap kelompok perlakuan

| Kelompok | Keterangan | Jumlah mencit |
|----------------------|--|---------------|
| I (kontrol normal) | Diberi 0,2 ml minyak jagung dan selanjutnya hanya diberi akuadest sampai akhir masa penelitian. | 5 |
| II (kontrol negatif) | Diinduksi dengan benzo()piren tanpa pemberian bahan uji. | 5 |
| III (preventif) | Diberi taurin dengan 7,8 mg/BB mencit/hari dimulai sejak dua minggu sebelum induksi benzo()piren. | 5 |
| IV | Setelah diinduksi benzo()piren, dilanjutkan pemberian taurin dengan dosis 3,9 mg/BB mencit/hari. | 5 |
| V | Setelah diinduksi benzo()piren, dilanjutkan pemberian taurin dengan dosis 7,8 mg/BB mencit/hari. | 5 |
| VI | Setelah diinduksi benzo()piren, dilanjutkan pemberian taurin dengan dosis 15,6 mg/BB mencit/hari. | 5 |

6. Pembedahan dan pembuatan jaringan paru

Pembuatan sediaan histologi organ paru dilakukan di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III, Bandar Lampung. Mencit yang telah diberi perlakuan dan yang tidak diberi perlakuan dimasukkan ke dalam desikator yang telah diberi kloroform untuk dibius sebelum dibedah. Mencit yang telah dibius dibedah dengan menggunakan peralatan bedah, kemudian diambil paru lalu dibersihkan dengan menggunakan larutan garam fisiologis, lalu ditimbang.

Paru yang telah ditimbang dicelupkan ke dalam larutan fisiologis HCl 0,01%, kemudian difiksasi di dalam larutan *Bouin* (campuran asam pikrat jenuh, formalin, asam asetat glacial = 15:5:1) selama 24 jam. Dalam proses pembuatan preparat dilakukan beberapa tahap yaitu tahap fiksasi, tahap dehidrasi, tahap *embedding*, tahap *cutting*, tahap *staining* dan tahap *mounting*.

Tahapan pembuatan preparat histologi paru menurut Ali (2007) yaitu :

a. Fiksasi

- a.1. Spesimen yang berupa paru mencit dicuci dengan larutan fisiologis HCl 0,01%, kemudian difiksasi dengan larutan *Bouin* selama 24 jam. Perbandingan antara volume *Bouin* dengan spesimen adalah 1:10.
- a.2. Kemudian paru tersebut dicuci dengan air mengalir
- a.3. Paru dimasukkan ke dalam *embedding cassette*.
- a.4. Lalu paru dicuci dengan air mengalir.

b. Dehidrasi

- b.1. Setelah dari proses pencucian, air dituntaskan.
- b.2. Spesimen paru kemudian didehidrasi dengan alkohol 80% selama 2 jam.
- b.3. Spesimen didehidrasi dengan alkohol 95% selama 2 jam.
- b.4. Spesimen didehidrasi kembali dengan alkohol 95% selama 1 jam.
- b.5. Kemudian spesimen didehidrasi sebanyak 2 kali dengan alkohol absolut selama 1 jam.
- b.6. Spesimen dicuci dengan xylol sebanyak 2 kali selama 1 jam.

c. Embedding

- c.1. Parafin cair dimasukkan ke dalam cangkir logam dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu di atas 58°C
- c.2. Kemudian parafin cair dituangkan ke dalam pan.
- c.3. Paru dipindahkan dari *embedding cassette* ke dasar pan.
- c.4. Cetakan dibiarkan sampai membeku.
- c.5. Parafin yang berisi spesimen paru dilepaskan dari pan dengan memasukkan ke dalam refrigerator dengan suhu 5°C beberapa saat.
- c.6. Parafin dipotong sesuai dengan letak spesimen yang ada dengan menggunakan pisau hangat.
- c.7. Potongan parafin tersebut ditanam atau ditempelkan pada blok kayu yang telah disiapkan.

d. Cutting

- d.1. Blok parafin yang siap disayat dimasukkan terlebih dahulu ke dalam refrigerator sesaat.

- d.2. Parafin kemudian disayat dengan menggunakan mikrotom setebal 4 μm secara *obliq*
- d.3. Sayatan yang berisi jaringan paru dipilih yang paling bagus.
- d.4. Kemudian sayatan diletakkan pada gelas objek, hindari adanya gelembung udara.
- d.5. Gelas objek yang berisi sayatan jaringan dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37⁰C agar sayatan benar-benar menempel pada gelas objek.

e. Staining

- e.1. Gelas objek yang berisi sayatan jaringan paru direndam di dalam xylol 1,2 dan 3 secara bertahap selama 5 menit.
- e.2. Gelas objek tersebut direndam di dalam alkohol absolut selama 5 menit.
- e.3. Gelas objek kemudian direndam di dalam aquades selama 1 menit.
- e.4. Sayatan jaringan paru diwarnai dengan Haematoxylin Eosin selama 20 menit.
- e.4. Sayatan jaringan dicuci kembali dengan aquades selama 1 menit
- e.5. Gelas objek yang berisi sayatan dicelupkan ke dalam acid alcohol sebanyak 2-3 kali celupan.
- e.6. Sayatan dicuci kembali dengan aquades selama 15 menit.
- e.7. Sayatan didehidrasi kembali dengan menggunakan alkohol 95% dan alkohol absolut masing-masing selama 3 menit.
- e.8. Gelas objek tersebut direndam kembali di dalam xylol selama 5 menit.

f. Mounting

Setelah proses pewarnaan selesai gelas objek yang telah berisi sayatan jaringan didiamkan hingga mengering, kemudian ditetesi dengan Canada balsam. Lalu ditutup dengan cover gelas.

g. Pengamatan dibawah mikroskop

Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 100 dan 400 kali. Sayatan yang nampak difoto, diamati, dan dihitung skor kerusakannya.

7. Pengamatan dan penilaian histologi

Pengamatan dilakukan dengan membandingkan preparat histologi paru-paru antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol normal dan kelompok kontrol benzo()piren. Penilaian derajat kerusakan paru-paru dilakukan secara kualitatif dengan menentukan kerusakan berupa nekrosis, kongesti, perdarahan, sel radang, erosi pada broncheolus, penebalan dinding septa alveoli, penyempitan dan pelebaran alveoli, fibrin, cairan oedema, dan granuloma. Kemudian dibandingkan antara kelompok kontrol normal dengan kelompok perlakuan.

Tabel 4. Skor penilaian derajat kerusakan histopatologi paru (Hansel dan Barnes, 2004)

| Tingkat perubahan | Keterangan | Skor |
|----------------------------|--|-------------|
| Normal | Tidak terjadi perubahan struktur histologi | 0 |
| Ringan (<i>mild</i>) | Kerusakan kurang dari sepertiga dari seluruh lapang pandang | 1 |
| Sedang (<i>moderate</i>) | Kerusakan sepertiga hingga dua pertiga dari seluruh lapang pandang | 2 |
| Berat (<i>severe</i>) | Kerusakan lebih dari dua pertiga dari seluruh lapang pandang | 3 |

Pengamatan secara histologi juga dilakukan dengan melihat penanda.

Penanda yang sering dijadikan ciri kanker tumbuh pada organ paru-paru adalah *nodule* atau sering disebut juga dengan bercak. *Nodule* pada paru paru adalah bercak-bercak yang tersebar di seluruh area paru paru dengan posisi yang acak, bentuk yang beragam dan ukuran yang tidak terdefinisi. Bercak bercak ini yang kemudian akan semakin berkembang dan mengganas menjadi kanker paru paru (Brody and Spira, 2006).

8. Pengamatan berat tubuh mencit (*Mus musculus*)

Selama percobaan diamati berat tubuh mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setiap 10 hari. Hasil pengamatan dicatat dan dibandingkan untuk setiap kelompok perlakuan.

9. Pengamatan berat basah paru mencit (*Mus musculus*)

Prosedur pengamatan berat basah organ paru dilakukan dengan menimbang organ paru yang masih segar dengan timbangan digital dengan 2 kali ulangan dan dibandingkan dengan berat basah organ paru yang tidak diberi perlakuan (kontrol) (Mansyur, 2002).

G. Analisis Data

Data dianalisis dengan metode statistik *one ways anova* (analisis varian satu arah) pada taraf nyata 5% ($p < 0,05$) dan untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan kemudian dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil). Data yang diperoleh dari pengamatan secara mikroskopis diuji dengan uji statistik menggunakan uji statistik *Kruskal-Wallis*, untuk

mengetahui adanya perbedaan dalam seluruh kelompok populasi. Data diolah dengan menggunakan Komputer Program Minitab 16 (Hanafiah, 2011).