

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April hingga Mei 2015.

Penginduksian zat karsinogen dan pemberian taurin kepada hewan uji dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Perhitungan jumlah sel leukosit dan sel eritrosit dilakukan di Laboratorium Patologi di Balai Pengujian dan Penyidikan Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung.

#### **B. Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bak berbahan plastik berukuran 20 x 30 cm sebanyak 30 buah sebagai wadah pemeliharaan mencit yang masing-masing dilengkapi tempat minuman dan tempat pakan serta tutup dari kawat, neraca analitik untuk menimbang berat badan mencit, kertas label, *tissue*, jarum suntik untuk menyuntikkan larutan karsinogen, sonde untuk mencekok, pemanas air dan panci untuk sterilisasi jarum suntik, gelas objek untuk meletakkan sediaan darah, pipet Thoma, kamar hitung untuk perhitungan sel darah, mikroskop, *blood counter tabulator*,

tutup *glass counter*, gunting, pipet tetes, plat tetes, pisau, haemositometer, dan kamera digital untuk dokumentasi.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor mencit (*Mus musculus*) jantan dari galur khusus yang berumur 5-7 minggu, pakan mencit Par G, air mineral untuk minum mencit, *oleum olivarum*, benzo ( $\alpha$ ) pyren, aquadest, larutan Hayem (NaCl 1 g + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g + HgCl 20,5 g + aquadest 200 mL), larutan Turk (asam asetat 13 mL + gentiana violet 21 mL + aquadest 100 mL), taurin, *ethylenediamine-tetraacetic acid* (EDTA) sebagai antikoagulan untuk mencegah pembekuan darah, dan giemsa untuk pewarnaan sediaan darah.

### C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan enam jenis perlakuan. Masing-masing perlakuan menggunakan lima pengulangan. Perlakuan yang diberikan yaitu:

1. Perlakuan 1 : Tidak diberi perlakuan (kontrol)
2. Perlakuan 2 : Diberi 0,2 mL *olive oil* dan aquades sampai akhir masa penelitian (kontrol negatif)
3. Perlakuan 3 : Diinduksi 0,5 mL larutan benzo ( $\alpha$ ) pyren tanpa Pemberian taurin (kontrol positif)
4. Perlakuan 4 : Diberi taurin 7,8 mg/bb mencit setiap hari selama dua minggu, kemudian diinduksi 0,5 mL larutan benzo ( $\alpha$ ) pyren selama 10 hari (preventif)

5. Perlakuan 5 : Setelah diinduksi 0,5 mL larutan benzo ( $\alpha$ ) pyren, diberi taurin 7,8 mg/bb mencit selama 15 hari (dosis I)
6. Perlakuan 6 : Setelah diinduksi 0,5 mL larutan benzo ( $\alpha$ ) pyren, diberi taurin 15,6 mg/bb mencit selama 15 hari (dosis 2)

## **D. Pelaksanaan Penelitian**

### **1. Persiapan Kandang**

30 buah bak plastik bersih berukuran 20 x 30 cm yang masing-masing diisi dengan serasah kayu khusus, dilengkapi dengan tempat minum, tempat pakan, dan tutup berbentuk segi empat yang terbuat dari kayu dan kawat. Bak-bak plastik tersebut diletakkan di dalam ruangan yang bersih dengan sirkulasi udara serta pencahayaan yang baik.

### **2. Persiapan Mencit**

Mencit yang digunakan adalah mencit jantan dari galur khusus berumur 5-7 minggu sebanyak 30 ekor dan ditempatkan di wadah yang terpisah, dengan masing-masing wadah berisi satu ekor mencit. Mencit diaklimatisasi selama 15 hari agar beradaptasi dengan kondisi kandang, dengan diberi pakan Par G dan minuman air mineral secara *ad libitum* (sampai kenyang). Semua mencit diusahakan agar kondisi kekebalan tubuhnya sama.

### 3. Persiapan Taurin

Taurin yang digunakan sesuai dengan dosis yang biasa digunakan oleh manusia yaitu 3 gr/70 kg berat badan manusia, kemudian dikonversi ke mencit dengan nilai 0,0026 menurut tabel konversi Suhardjono (1995). Hasil konversi yang diperoleh dari perhitungan 3000 mg dikali dengan 0,0026 adalah 7,8 mg/bb/hari. Dosis yang digunakan untuk pengujian adalah 7,8 dan 15,6 mg/bb/hari.

### 4. Induksi Karsinogenik

Induksi zat karsinogen dilakukan dengan menyuntikkan larutan benzo ( $\alpha$ ) pyren pada jaringan subkutan mencit di bagian tengkuk. Larutan karsinogenik diperoleh dengan melarutkan 0,3 g benzo ( $\alpha$ ) pyren dengan 0,2 mL *oleum olivarum* (Saputri, Dyah, dan Abdulgani, 2006). Injeksi larutan karsinogenik dilakukan setiap hari selama 10 hari. Setelah itu, mencit diberi larutan taurin dengan cara dicekok selama 15 hari.

### 5. Analisis sel darah

Sampel darah diambil dengan menggunakan jarum suntik, kemudian dimasukkan ke dalam tabung EDTA yang telah diberi label agar tidak tertukar. Tabung-tabung EDTA berisi sampel kemudian diletakkan di atas *roller* agar homogen. Penggunaan tabung EDTA dimaksudkan agar sampel darah tidak menggumpal.

### 5.1 Perhitungan sel darah putih (leukosit)

Perhitungan leukosit dilakukan dengan menggunakan pipet Thoma leukosit. Sampel darah dihisap sampai angka 0,5, kemudian ujung pipet dicelupkan ke dalam larutan Turk. Larutan Turk dihisap sampai angka 11 sehingga diperoleh pengenceran 1:20. Kemudian kedua ujung pipet ditutup dengan jari dan dibolak-balik dengan membentuk angka delapan selama kurang lebih tiga menit.

Larutan suspensi darah kemudian diteteskan, 2-3 tetes pertama dibuang, selanjutnya diteteskan di atas kamar hitung. Setelah ditutup dengan *cover glass*, preparat didiamkan selama satu menit untuk melisiskan eritrosit. Perhitungan leukosit dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40 kali pada empat kotak besar kamar hitung. Jumlah leukosit yang ditemukan dikalikan dengan 50 merupakan jumlah leukosit per milimeter kubik ( $\text{mm}^3$ ) (Tambur, 2006).

### 5.2 Perhitungan Sel Darah Merah (Eritrosit)

Sampel darah dihisap dengan dengan pipet khusus eritrosit hingga angka 0,5. Larutan yang digunakan sebagai suspensi adalah larutan Hayem, dihisap hingga angka 101, kemudian dibolak-balik membentuk angka delapan selama tiga menit agar homogen. Tetesan suspensi darah pertama dan kedua dibuang, kemudian diteteskan ke atas kamar hitung lalu ditutup dengan *cover glass*.

Perhitungan dilakukan di bawah mikroskop dengan menghitung sel yang terlihat di dalam kotak-kotak yang terdapat pada kamar hitung. Jumlah sel leukosit dapat diketahui dengan menghitung sel yang terlihat di dalam empat kotak besar di bagian tepi. Adapun sel eritrosit dapat diketahui jumlahnya dengan menghitung sel yang terlihat di dalam lima kotak berukuran sedang di bagian tengah.

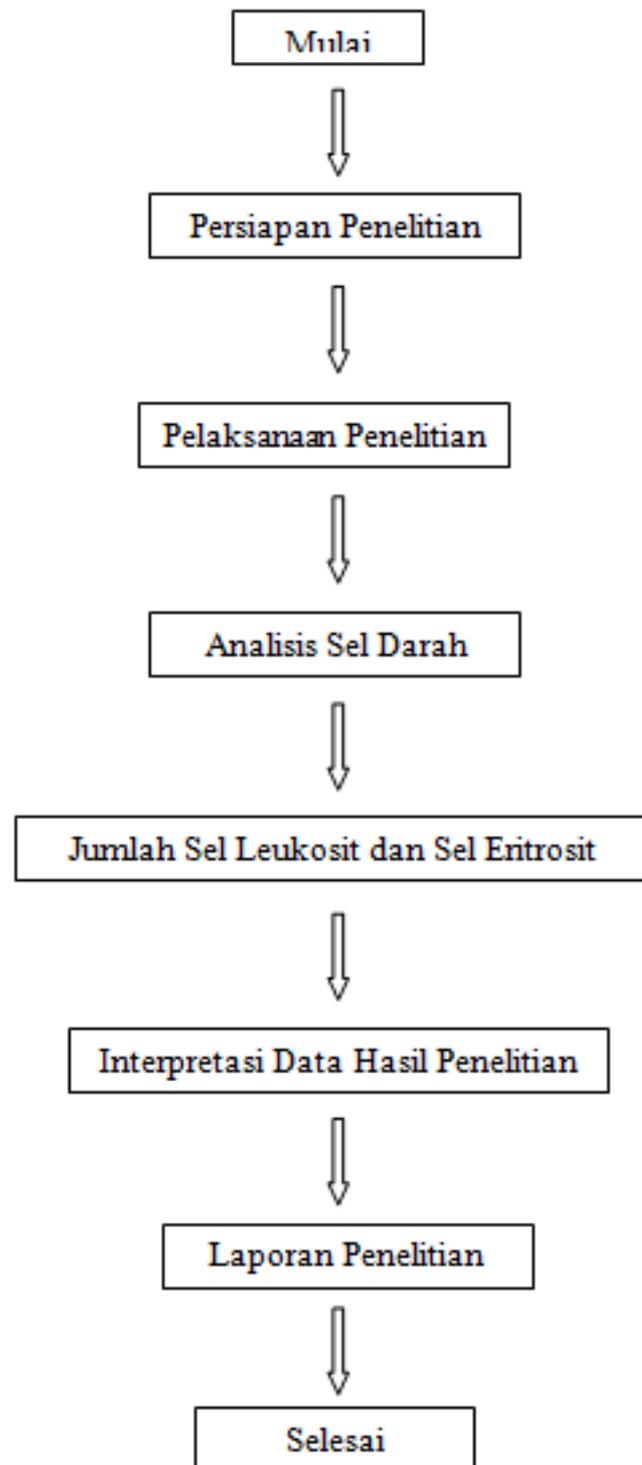
#### **E. Parameter Penelitian**

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah sel-sel leukosit dan jumlah sel-sel eritrosit mencit.

#### **F. Analisis Data**

Data yang diperoleh dari hasil percobaan akan dianalisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) pada taraf uji  $\alpha$  5%, yang dilanjutkan dengan uji BNT pada taraf  $\alpha$  5%

### G. Diagram Alir Penelitian



Gambar 3. Diagram Alir Penelitian