

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Anatomi dan pemeriksaan darah di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, dimulai tanggal 28 Nopember 1992 sampai 8 Januari 1993.

3.2. Materi Penelitian

Hewan percobaan yang digunakan adalah kelinci betina berumur tujuh bulan dengan jumlah 20 ekor dengan berat badan rata-rata 1000 sampai 1300 gram. Kelinci diberikan pakan berupa hijauan segar, sayuran dan pellet komersial.

Kandang yang digunakan berupa kandang panggung yang terbuat dari kayu, berikut tempat pakan dan minum. Pemberian pakan dilakukan setiap pagi dan sore hari secara teratur.

Peralatan penelitian berupa jarum Akupunktur berukuran 3 sentimeter, sebuah elektrik akupunktur, kapas dan alkohol 70 persen untuk pengambilan darah diperlukan jarum suntik 22,5 gauge sebanyak 40 buah, tabung reaksi ukuran 10 mililiter sebanyak 40 buah dan rak tabung reaksi.

3.3. Metode Penelitian

Kelinci betina sejumlah 20 ekor, sebelum diadakan perlakuan akupunktur dilakukan pengambilan darah dan pemeriksaan sebagai kontrol. Perlakuan Akupunktur dilakukan perlakuan khusus yaitu dengan mengakupunkturkan setiap anggota sehari sekali selama 15 menit tiga hari dan pada hari keempat dilakukan pengambilan darah melalui *Vena auricularis*.

Prosedur Perlakuan Akupunktur

Hewan ditempatkan pada matras penggantung sehingga ke empat kaki tersebut dapat bebas bergerak. Pada costae nomer XI atau 1,5 cm dari garis tengah vertebral ditengah lekukan dilakukan penusukan dengan jarum akupunktur yaitu pada titik nomer 25 (kanan dan kiri) kemudian kedua jarum akupunktur tersebut, dihubungkan dengan elektrik akupunktur dengan tegangan 40 milivolt, frekwensi 15 hertz, intensitas rangsangan sebesar tiga dan periodik waktunya kontinyu selama 15 menit. Perlakuan tersebut diulang kembali pada hari berikutnya selama tiga hari.

Sampel Darah

Pengambilan sampel darah melalui *Vena auricularis* kira-kira 1 mililiter darah dari tiap ekor kelinci. Darah yang telah diperoleh, secara perlahan-lahan dimasukkan dalam botol yang telah diberi antikoagulansia (EDTA) dan

digoyang-goyang supaya tercampur. Darah yang telah didapat ini untuk selanjutnya dihitung jumlah dan jenis leukositnya.

Penghitungan populasi leukosit

Dipakai pipet dari Thoma yang khusus leukosit. Pada pipet ini menggunakan skala 0,5 dan 11 dan bagian yang menggelembung terdapat alat untuk mengaduk. Larutan yang digunakan larutan Turk. Mula-mula darah vena dengan anti koagulansia dihisap sampai tanda 0,5 dan dilanjutkan menghisap larutan Turk sampai tanda 11, berarti pengenceran 20 kali. Penghitungan dilakukan cukup 2 kali dengan mempergunakan satu pipet dengan syarat dilakukan dengan teliti. Penghitungan dilakukan atas leukosit-leukosit yang terdapat dalam empat-empat persegi yaitu "W" serta digunakan obyektif 10 kali. Penghitungan leukosit yang ada ialah dengan menghitung jumlah leukosit yang terdapat dalam ke empat persegi tadi misalnya N. Volume empat persegi tadi adalah $0,1 \times 4 = 0,4$ sentimeter. Dengan pengenceran 20 kali, maka jumlah leukosit yang ada ialah 50 kali jumlah hasil penghitungan dalam kamar penghitung.

Penghitungan jenis leukosit

1. Pembuatan Hapusan Darah

Setetes darah vena yang telah diberi antikoagulan diletakkan dekat salah satu ujung gelas obyektif. Gelas penghapus dipegang sedemikian rupa sehingga membuat sudut 30 derajat dengan gelas obyektif dan tetesan darah tadi terletak dalam sudut tersebut. Gelas penghapus ini digeserkan ke arah tetesan darah sehingga menyentuh dan darah tadi akan merata antara kedua ujung gelas penghapus dan obyektif. Dengan kecepatan tertentu gelas penghapus digeserkan ke arah yang berlawanan dengan geseran pertama sampai mencapai ujung lainnya, demikian didapatkan hapusan darah yang tipis. Hapusan ini segera dikeringkan dengan menggerak-gerakkan di udara atau dengan kipas angin. Setelah kering dapat dilakukan pengencatan dengan cara Wright.

2. Pengencatan Hapusan Darah

Dipakai Wright's stain yang menggunakan eosin dan methylene blue dengan pelarut metanol, serta dipakai bufer fosfat pH 6,4. Hapusan yang sudah kering ditetesi dengan Wright's stain hingga tertutup seluruhnya. Waktu pengencatan 2 menit. Pengencatan dilanjutkan dengan menambah larutan buffer 1 atau 1,5 kali banyaknya wright's stain tadi. Pencampuran ini dibantu pula dengan meniup-niup beberapa kali, dan ditunggu 20 menit sehingga sel-sel tercat dengan baik. Hapusan dicuci dengan air kran yang cukup ba-

dengan baik. Hapusan dicuci dengan air kran yang cukup banyak dituangkan pada hapusan darah yang masih berada diatas rak, sehingga semua cat hanyut. Hapusan diletakkan pada sisinya dan ditunggu sampai kering dengan sendirinya. Dari hasil ini dapat dihitung jenis leukositnya.

3. Cara Menghitung Jenis Leukosit

Dihitung minimal 100 sel, dilakukan pada daerah penghitungan (*area counting*). Dimulai dari satu sisi dan bergerak menuju ke sisi lain, lalu pindah sejauh 2-3 lapangan pandang ke kiri atau ke kanan dan menuju sisi semula.

Pada setiap lapangan pandang dihitung jumlah leukosit dengan alat *blood cell counter*, sampai didapatkan jumlah 100 sel darah putih. Kemudian dihitung masing-masing jenis dan didapatkan gambaran seperti :

Eo	Ba	Neutrofil	lim	Mo
7	0	1	49	2
		Stab	-Seg	

3.4. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) (Kusriningrum, 1989).

3.5. Parameter Yang Diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah dan hitung jenis leukosit (eosinofil, neutrofil, basofil, monosit dan limfosit).

3.6. Analisis Hasil

Analisis statistik dari data hasil penelitian menggunakan Uji t, dimana terdapat dua kelompok dan 20 ulangan. t hitung yang didapat dibandingkan dengan t tabel.