

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November – Desember 2023 bertempat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Adapun alat yang akan digunakan dalam uji ini adalah : Tempat makan dan minum, kandang tikus, alat tulis, timbangan, sonde oral, mikrohematokrit, tabung sahli, pipet Thoma eritrosit, hemositometer double improved Neubauer, mikroskop, mikrosentrifuge, skala hematokrit, dan botol kaca.

3.2.2 Bahan Penelitian

Penelitian ini akan menggunakan bahan antara lain : S spuit 1ml, tabung edta, *gloves*, tikus putih jantan *Sprague Dawley*, pakan hewan coba (pellet), air minum, fermentasi buah berenuk, sampel darah tikus, ketamine, HCL 0,1 N, larutan hayem, aquades, kain kasa, tabung kapiler, creatosol, enzim pectinase, gula.

3.2.3 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus putih *Sprague Dawley* berjenis kelamin Jantan, dengan umur 6 bulan dan memiliki berat badan 300g. Sebelum diberikan perlakuan tikus harus menjalani masa adaptasi selama 1 minggu.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan pada uji ini adalah eksperimental laboratorik yang menggunakan tikus *Sprague Dawley* untuk diambil sampel darahnya. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan dan 5 pengulangan. Rata-rata perhitung ulangan menggunakan rumus Federer yaitu $(n-1) K \geq 16$. Keterangan : n = Jumlah Ulangan dan K = Jumlah Kelompok. Hasil perhitungan rumus Federer sebagai berikut : $(n-1) k \geq 16 = 4 (n-1) \geq 16 = 4n-4 \geq 16 = n \geq 6+4 = 4n \geq 20$ $n = n \geq 20 : 4 = n \geq 5$. Jadi jumlah ulangan rumus Federer adalah 5 ekor ulang / kelompok.

3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini dikelompokkan menjadi tiga jenis yaitu variabel bebas, variabel terikat, dan variabel kendali. Variabel bebas yaitu fermentasi buah berenuk dan dosis. Variabel kendali yaitu umur, berat tikus, jenis kelamin tikus. Variabel terikat yaitu indeks eritrosit tikus *Sprague Dawley* dengan parameter MCV, MCH dan MCHC.

3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Penelitian ini akan dilakukan dengan teknik pengambilan sampel secara *post test* atau setelah hewan coba diberikan perlakuan. Sampel darah di ambil pada hari ke – 15.

3.5 Prosedur Pengambilan Sampel

3.5.1 Pembuatan Fermentasi Buah Berenuk (*Crescentia cujete L.*)

Buah berenuk yang digunakan diperoleh dari tumbuhan yang berada di lingkungan kampus UWKS. Buah berenuk dicuci dengan air mengalir lalu dikupas. Daging buah dipotong menjadi beberapa bagian kecil dan dihaluskan kemudian difermentasi dengan komposisi sebagai berikut : air : buah : gula : pektinase (Pectinex® Ultra AFP, Novozymes, London, UK) dengan perbandingan berat 1.000 : 400 : 40 : 40. Campuran disimpan dalam botol pada suhu 25°C selama 30 hari. Kain kasa digunakan sebagai penutup mulut botol. Campuran tersebut diaduk secara manual setiap 24 jam. Pada hari terakhir, hasil fermentasi dikumpulkan dan ditempatkan dalam botol kaca steril, lalu simpanlah dalam lemari es dengan suhu 4°C.

3.5.2 Perlakuan Hewan Coba

Tikus *Sprague Dawley* sebanyak 20 ekor, terdapat 4 perlakuan dan 5 ulangan. Tikus dipilih secara acak dimana dalam 1 kandang terdapat 5 ekor tikus *Sprague Dawley* dengan ukuran kandang 45 x 20 x 30 yang dialas dengan sekam kayu setebal 5cm. Tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu, dengan tujuan membantu hewan coba untuk menyesuaikan diri dengan lingkungan baru, mengurangi stress pada hewan coba, dan memastikan hewan coba dalam kondisi sehat dan layak untuk dilakukan pengujian (Nelson, 2016). Perlakuan dilakukan selama 14 hari. Tikus diberikan makan berupa pellet Rat Bio (RBI) sebanyak 20 - 30gram secara 2 kali sehari, pada pagi dan sore hari serta

minum secara *ad libitum*. Tikus yang digunakan pada penelitian ini (Tikus *Sprague Dawley*, Indonesia) dengan memperhatikan keadaan fisik. Tikus yang sehat memiliki bulu yang bersih dan mengkilap, mata yang jernih, hidung dan telinga yang bersih.

Perlakuan yang dilakukan pada tikus diberikan label P1, P2, P3, P4, antara lain : P1 yaitu tikus tanpa pemberian fermentasi buah berenuk dengan dosis 0 mg/kg BB. P2 yaitu tikus dengan pemberian fermentasi buah berenuk dengan dosis 50 mg/kg BB. P3 yaitu tikus dengan pemberian fermentasi buah berenuk dengan dosis 500 mg/kg BB. P4 yaitu tikus dengan pemberian fermentasi buah berenuk dengan dosis 5000 mg/kg BB. Sebelum dilakukan perlakuan, tikus dipuasakan selama 14 jam untuk menjaga kadar glukosa darah tetap stabil dan menghindari asupan makanan yang dapat mempengaruhi proses pengujian. Sediaan uji diberikan dalam dosis tunggal menggunakan sonde oral. Sonde oral dimasukkan kedalam mulut lalu di luncurkan pada langit-langit kearah belakang sampai ke esophagus kemudian masuk ke lambung. Volume maksimal pemberian sediaan uji secara oral kepada tikus adalah 2 ml.

Sebelum dilakukan proses pengambilan sampel hewan coba di anastesi agar terbebas dari rasa sakit. Anastesi yang digunakan adalah anastesi umum menggunakan ketamin. Ketamin yang digunakan (Ket-A-100®, Indonesia). Setelah dilakukan pengambilan sampel, hewan coba akan di *euthanasia* dengan cara injeksi *intramuscular* menggunakan ketamin dengan dosis 100mg/kg BB. Hewan yang sudah di euthanasia dimusnahkan menggunakan mesin incinerator

yang terdapat di Laboratorium Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo.

3.5.3 Proses Pengambilan Darah

Hari ke 15 semua tikus diambil darahnya. Pengambilan sampel dilakukan melalui vena *cavum orbita* sebanyak 1mL menggunakan mikro hematokrit. Darah yang diperoleh dimasukkan kedalam tabung dengan antikoagulan EDTA berukuran 3mL. Darah dihomogenkan dan disimpan kedalam *cooling box* untuk dilakukan pengujian darah menggunakan nilai indeks eritrosit.

Koleksi sampel darah diambil melalui mata dengan cara, tikus dianestesi terlebih dahulu menggunakan ketamin (50 mg/kg BB). Tikus diambil darahnya menggunakan mikrohematokrit pada vena *cavum orbita* . Hematokrit dimiringkan 45° ke arah medio superior cavum orbita lalu di gerak – gerakan hingga masuk kedalam sambil di putar-putar hingga darah keluar.

3.5.4 Pengujian RBC

Red blood cell (RBC) adalah jumlah total sel darah merah. Pengujian RBC menggunakan pipet thoma eritrosit. Darah diambil menggunakan pipet thoma eritrosit sampai pada tanda 0,5. Kemudian darah diencerkan dengan larutan Hayem sampai tanda 101. Homogenkan darah dengan cara memutar pipet seperti membentuk angka 8 sebanyak 80kali. Sebelum di teteskan ke dalam kamar hitung eritrosit, buanglah 3 tetes cairan yang berada di dalam tabung eritrosit lalu teteskan darah di kamar hitung eritrosit. Diamkan darah selama 2 menit agar eritrosit statis. Selanjutnya amati di mikroskop dengan perbesaran 40 kali.

Pada kamar hitung terdapat 9 kotak besar, perhitungan eritrosit dimulai pada kotak bagian tengah yang berukuran besar. Eritrosit yang dihitung hanya 5 kotak yang berada di dalam 9 kotak kecil pada bagian tengah kotak. Selanjutnya jumlah total eritrosit di 5 kotak tersebut dikalikan dengan 10.000 (Nabila *et al.*, 2020).

3.5.5 Pengujian Hematokrit

Perhitungan hematokrit dapat dilakukan secara manual dengan metode yang dikembangkan oleh Rodak (Keohane *et al.*, 2015), dengan menggunakan hemositometer *double improved Neubauer* untuk perhitungan jumlah eritrosit kemudian sentrifus mikrohematokrit untuk menentukan hasil hematokrit.

3.5.6 Pengujian Hemoglobin

Pengujian hemoglobin secara manual dapat dilakukan menggunakan metode Sahli, dimana perubahan warna hematin coklat dari hemoglobin dan asam klorida 0,1 N dibandingkan dengan standart hemoglobinometer. Tabung sahli diisi dengan larutan HCl 0,1 N sampai mencapai tanda 2, lalu sampel darah disedot menggunakan pipet sahli hingga mencapai tanda 20 µl. Darah yang berlebih dibersihkan menggunakan tissue, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sahli. Tunggu 5 – 10 menit sampai terjadi pembentukan asam hematin, lalu tambahkan aquades hingga warna sama dengan standar lalu baca dalam g/dL (Nugraha, 2017).

3.5.7 Perhitungan Nilai MCV

Mean corpuscular volume (MCV) adalah volume rata-rata sel eritrosit, dapat dihitung dengan cara sebagai berikut : $MCV = \frac{PCV \times 10}{RBC}$. PCV merupakan

nilai *hematokrit* yang dinyatakan dalam % sedangkan RBC adalah jumlah eritrosit dengan satuan juta/mikroliter (Gandasoebrata, 2013).

3.5.8 Perhitungan Nilai MCH

Mean corpuscular hemoglobin (MCH) adalah perhitungan rata-rata hemoglobin dalam satu eritrosit, dapat dihitung dengan cara sebagai berikut :

$$\text{MCH} = \frac{\text{HB} \times 10}{\text{RBC}}$$

HB disebut dalam bentuk gram/dl dan RBC merupakan jumlah eritrosit dengan satuan juta/mikroliter (Gandasoebrata, 2013).

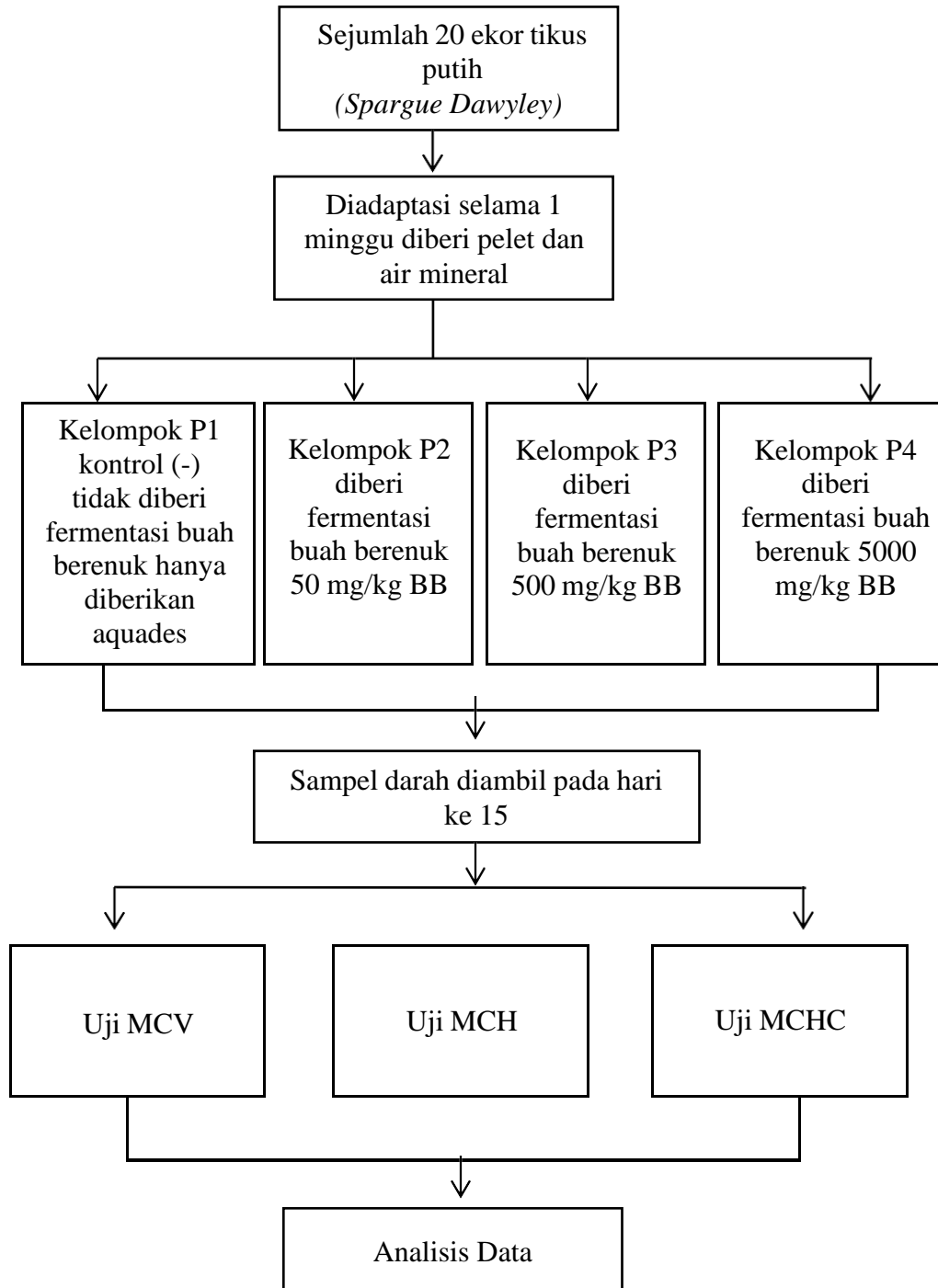
3.5.9 Perhitungan Nilai MCHC

Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) adalah perhitungan rata-rata konsentrasi hemoglobin dalam satu eritrosit, dapat dihitung dengan cara sebagai berikut : $\text{MCHC} = \frac{\text{HB} \times 10}{\text{PCV}}$. HB disebut dalam gram/dl sedangkan PCV merupakan nilai *hematokrit* yang dinyatakan dalam % (Gandasoebrata, 2013).

3.5.10 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan indeks eritrosit pada tikus *Spargue Dawley* dianalisis menggunakan uji ANOVA. Taraf signifikansi yang 5%. Uji statistik dilakukan dengan software SPSS versi 26.

3.6 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 3.1 : Kerangka Penelitian