

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya pada bulan Januari hingga Februari 2024.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu fermentasi buah berenuk, sampel darah tikus *Sprague Dawley*, pakan hewan coba, air mineral, methanol (Supelco, Indonesia), reagen turk (Indo Reagent), reagen giemsa (Onemed, Indonesia), oil emersi (Indo Reagent, Indonesia), ketamin (Ket-A-100®, Indonesia), masker, tissue, dan gloves.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kandang hewan coba, tempat pakan dan minum, timbangan, object glass, mikrohematokrit, sonde oral, pipet thoma leukosit (skala 0,5-11), haemocytometer, aspirator, cover glass, cell counter, rak pewarnaan, mikroskop dan tabung EDTA.

3.2.3 Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan Tikus putih *Sprague Dawley* jantan sehat yang berumur 6 bulan dengan berat 250 gram sebanyak 20 ekor.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik menggunakan tikus putih *Sprague Dawley* yang dipilih secara random lalu dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan dan 5 ulangan dengan dosis uji setiap kelompok yang berbeda-beda. Perhitungan ulangan menggunakan rumus Federer yaitu $(n-1)k \geq 16$. Keterangan, n adalah jumlah ulangan dan k adalah jumlah kelompok. Hasil perhitungan rumus Federer adalah sebagai berikut ; $(n-1) k \geq 16 = 4(n - 1) \geq 16 = 4n-4 \geq 16 = 4n \geq 16+4 = 4n \geq 20 = n \geq 20 : 4 = n \geq 5$ (ulangan).

3.3.2 Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan 3 variabel yaitu :

1. Variabel kendali yaitu fermentasi buah berenuk dan dosis pemberian simplisia yaitu 50, 500 dan 5.000 mg/kg BB.
2. Variabel terikat yaitu jumlah limfosit dan monosit tikus *Sprague Dawley*.
3. Variabel bebas yaitu tikus *Sprague Dawley* jantan berumur 6 bulan berat 250 gram.

3.3.3 Parameter Penelitian

Parameter pada penelitian ini meliputi jumlah monosit dan limfosit pada sampel darah tikus *Sprague Dawley* pasca perlakuan.

3.3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dalam penelitian ini pada akhir periode riset (*Post Test*). Masing-masing tikus *putih Sprague Dawley* diambil dan dipilih secara acak kemudian dilakukan anestesi menggunakan ketamin 50 mg/kg BB. Pengambilan

darah menggunakan mikrohematokrit melalui vena *ophthalmica*. Darah disimpan dalam tabung Vaculab EDTA K3. Tabung disimpan dalam termos pendingin dengan suhu 4°C agar tidak lisis.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Fermentasi Buah Berenuk

Buah berenuk yang digunakan diperoleh dari tumbuhan yang berada dilingkungan kampus UWKS. Buah berenuk dicuci dengan air mengalir lalu dikupas. Daging buah dipotong kecil – 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.

3.4.2 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus *Sprague Dawley* jantan yang berumur 6 bulan dengan berat \pm 250 gram yang dibagi ke dalam 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus dipilih secara acak dimana didalam satu kandang terdapat 5 ekor tikus. Tikus ditempatkan di dalam kandang akrilik yang berukuran 30 x 20 x 30 dengan alas sekam kayu setebal 5 cm dan diadaptasi selama 7 hari dan diberi makan berupa pelet Rat Bio (RB1) sebanyak 20-30 gram didalam satu wadah yang diletakkan dalam kandang setiap 2 kali sehari, pada pagi dan sore hari, serta air mineral secara ad libitum yang disediakan melalui dot navo yang diikat disamping kandang.

3.4.2 Penentuan Dosis Uji Toksisitas

Penentuan dosis merujuk pada BPOM RI (2022) yaitu semakin kecil nilai LD50 maka semakin toksik senyawa tersebut. Sebaliknya semakin besar nilai LD50 maka semakin rendah toksisitasnya. Pada penelitian ini dosis yang digunakan sebesar 50 mg/kg BB , 500 mg/kg BB dan 5000 mg/kg BB.

3.4.3 Perlakuan Pada Hewan Coba

Tikus *Sprague Dawley* yang digunakan dalam penelitian ini diberikan perlakuan yaitu sediaan uji dalam dosis tunggal dengan menggunakan sonde oral. Sonde oral dimasukkan kedalam mulut, kemudian diluncurkan pada langit langit ke arah belakang sampai ke esofagus kemudian masuk ke lambung. Volume maksimal pemberian sediaan uji secara oral kepada tikus ialah 2 ml. Sediaan uji diberikan selama 14 hari pada 3 kelompok dan 1 kelompok kontrol yang tidak diberikan. Sampel darah diambil pada hari ke-15. Tikus yang sudah diambil darah akan di euthanasia menggunakan ketamin LD50 dengan dosis 50 mg/kg BB.

3.5 Perhitungan Leukosit

Sampel darah yang diambil pada hari ke-15 dimasukkan ke dalam tabung EDTA. Sampel darah diambil menggunakan pipet Thoma leukosit yang telah dilengkapi dengan aspirator sampai skala 0,5. Tambahkan reagen turk sampai skala 11 lalu bersihkan pipetnya dengan tissue, kemudian lepaskan aspirator lalu dihomogenkan dengan cara diputar seperti angka 8 sebanyak 80 kali. Sampel diteteskan pada haemocytometer atau cekungan diantara kamar hitung dan ditutup dengan cover glass. Amati pada mikroskop dengan perbesaran 100x. Terdapat 9 kotak besar pada kamar hitung. Perhitungan leukosit dilakukan pada 4 kotak besar

dimasing-masing ujung. Total jumlah leukosit di 4 kotak dikalikan 50 (Yunani, *et al.*, 2021). Presentase leukosit dilakukan untuk mendapatkan hasil absolut.

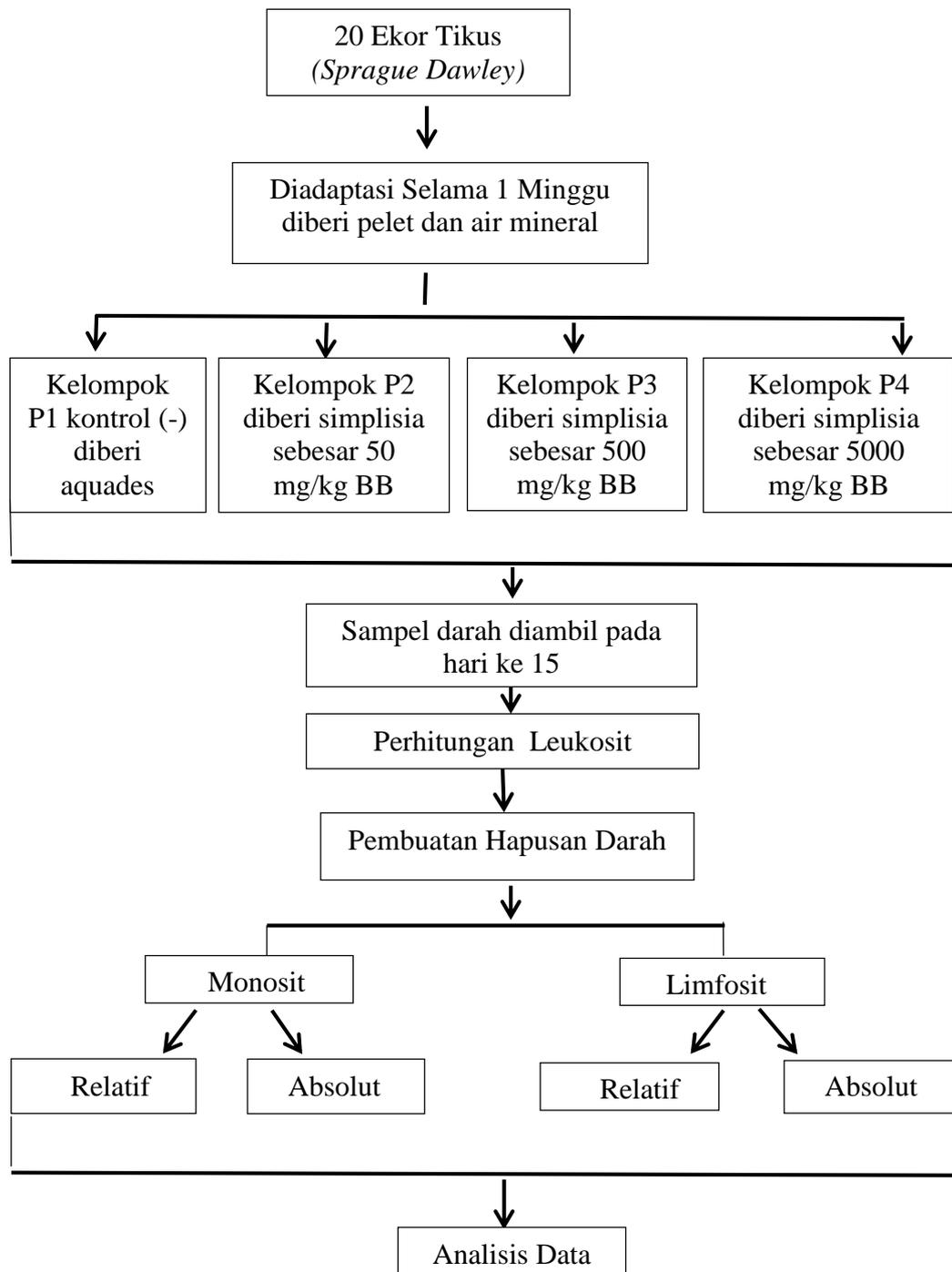
3.6 Perhitungan Limfosit dan Monosit

Sampel darah yang diambil pada hari ke-15 dimasukkan ke dalam tabung EDTA. Sampel darah ditetaskan pada objek glass dan dibuat preparat apus. Preparat apus kemudian difiksasi dengan metanol 70 % selama 3 menit. Preparat kemudian diwarnai dengan pewarnaan Giemsa selama 20 detik. Preparat dicuci dengan air mengalir dan dibiarkan mengering. Preparat diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dengan ditetesi oil emersi. Jumlah limfosit, monosit dan leukosit yang lain dihitung dengan cell counter sampai 100 sel. Hasil dilaporkan dengan satuan %. Tentukan presentase monosit dan limfositnya untuk mendapatkan hasil relatif. Hasil absolut dihitung dengan cara mengalikan hasil relatif dengan jumlah leukosit. Satuan yang digunakan adalah sel/mm³.

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian adalah data monosit dan limfosit secara relatif dan absolut. Data dianalisis menggunakan uji ANOVA

3.8 Kerangka Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Penelitian