

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Penelitian dilakukan pada bulan Januari-Februari 2024.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba, tempat makan dan minum, timbangan, pipet eritrosit, kamar hitung, aspirator, pipet leukosit, cover glass, mikroskop, tabung EDTA.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah fermentasi buah berenuk, tikus *Sprague Dawley* jantan, pakan hewan coba, air mineral, reagen Hayem, reagen Turk, gloves, spuit, tisu, sampel darah, 400 gram buah berenuk.

3.2.3 Subjek Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan tikus putih (*Sprague Dawley*) jantan sehat yang berumur 6 bulan dengan berat 300 gram. Tikus *Sprague Dawley* yang digunakan sebanyak 20 ekor.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan desain penelitian *post test* menggunakan *complete random sampling* (CRD). Tikus *Sprague Dawley*

dipilih secara random lalu dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan dan 5 ulangan. Rata-rata perhitungan ulangan menggunakan rumus Federer yaitu : $(n-1)k \geq 16$. Ket : n = jumlah ulangan, k = jumlah kelompok. Hasil perhitungan Rumus Federer sebagai berikut : $(n-1) \geq 16 = 4 (n-1) \geq 16 = 4n-4 \geq 16 = 4n \geq 16 + 4 = 20 \rightarrow n = 5$ (ulangan).

3.3.2 Variabel Penelitian

Berdasarkan uraian materi dalam penelitian terdapat 3 variabel, yaitu variabel terikat yang meliputi profil eritrosit dan leukosit. Variabel bebas meliputi umur, berat tikus, dan jenis kelamin tikus. Variabel kontrol meliputi fermentasi buah berenuk dan dosis.

3.3.3 Parameter Penelitian

Parameter pada penelitian ini adalah profil eritrosit dan leukosit yang diberikan simplisia fermentasi buah berenuk.

3.3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan darah menggunakan mikrohematokrit dan dijaga agar tidak terjadi hemolisis. Darah diambil dari vena ophthalmica (pleksus retro-orbitalis) pada mata. Darah disimpan dalam tabung EDTA. Tabung disimpan dalam lemari es suhu 4°C.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus *Sprague Dawley* jantan yang berumur 6 bulan dengan berat 250 gram yang dibagi ke dalam 4 kelompok

perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor. Hewan tersebut diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan dan selama proses adaptasi dilakukan pengamatan kondisi umum. Hewan uji diberikan pakan tanpa batas (*ad libitum*) dan air putih. Sebelum perlakuan, tikus dipuasakan terlebih dahulu sebelum diberikan bahan uji.

3.4.2 Cara Fermentasi Berenuk

Buah berenuk yang digunakan diperoleh dari tumbuhan yang berada di lingkungan kampus UWKS. Buah berenuk dicuci dengan air mengalir lalu dikupas. Daging buah dipotong kecil – kecil kemudian difermentasi dengan komposisi sebagai berikut : air : ampas : gula : pektinase (Pectinex® Ultra AFP) 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 disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C.

3.4.3 Penentuan Dosis Uji Toksisitas

Dosis uji pada uji toksisitas akut terdapat dalam beberapa tingkatan dosis yang akan diberikan pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok. Dosis yang diberikan antara lain : 50 mg/kg BB , 500 mg/kg BB dan 5000 mg/kg BB. Kelompok perlakuan dalam penelitian ini yaitu K1 = control, K2 = dosis fermentasi buah berenuk 50 mg/kg BB, K3= dosis fermentasi buah berenuk 500 mg/kg BB, dan K4 = dosis fermentasi buah berenuk 5000 mg/kg BB.

3.4.4 Perlakuan Pada Hewan Coba

Tikus *Sparague Dawley* dipuasakan sebelum diberikan perlakuan. Tikus ditimbang dan diberikan sediaan uji. Sediaan uji diberikan dalam dosis tunggal dengan menggunakan metode sonde oral. Senyawa uji diberikan 1 kali 1 hari sesuai dosis selama 14 hari kemudian dilakukan pengambilan sampel darah untuk dilakukan pemeriksaan pada hari ke 15.

3.4.4.1 Penghitungan Jumlah Eritrosit

Sampel darah dihisap ke dalam pipet eritrosit sampai tanda 0,5 tambahkan larutan hayem dengan cara dihisap sampai tanda 101. Tutup kedua ujung pipet dengan ibu jari dan jari tengah, lalu dihomogenkan dengan cara kocok membentuk angka 8 selam kurang lebih 2 menit. Larutan Hayem yang terdapat di bagian kapiler dibuang dengan cara ditetesken sebanyak 3 tetes. Larutan darah dimasukkan ke dalam kamar hitung dengan menempelkan ujung pipet pada cover glass. Kamar hitung yang sudah terisi diletakkan di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x lalu hitung jumlah eritrosit. Hasil perhitungan dikalikan 10.000 (Fadilah *et al.*, 2022).

3.4.4.2 Penghitungan Jumlah Leukosit

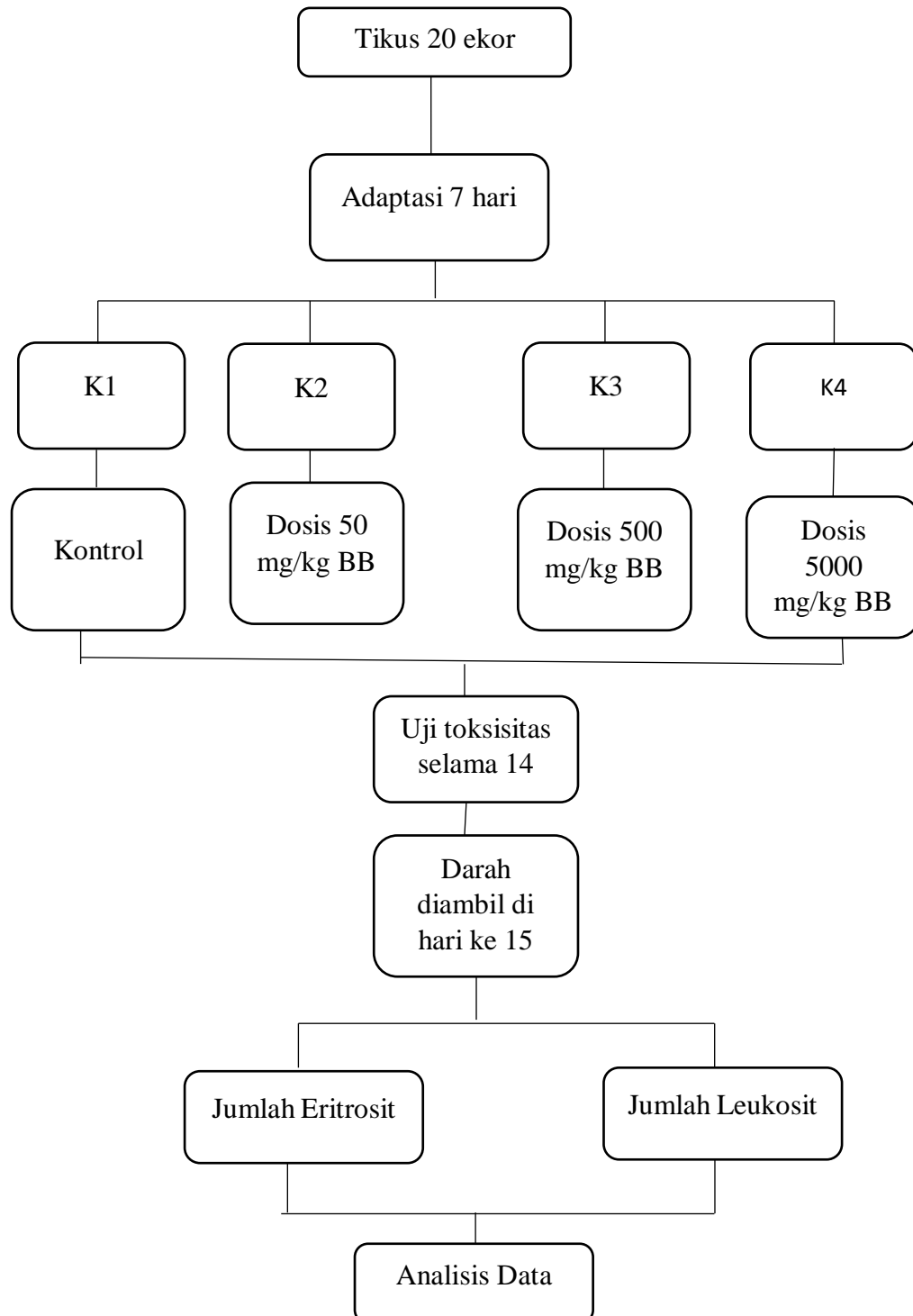
Sampel darah dihisap ke dalam pipet leukosit sampai tanda 0,5 tambahkan larutan Turk dengan cara dihisap sampai tanda 11. Tutup kedua ujung pipet dengan ibu jari dan jari tengah, lalu dihomogenkan dengan cara kocok membentuk angka 8 selam kurang lebih 2 menit. Larutan Turk yang terdapat di bagian kapiler dibuang dengan cara ditetesken sebanyak 3 tetes. Larutan darah

dimasukkan ke dalam kamar hitung dengan menempelkan ujung pipet pada cover glass. Kamar hitung yang sudah terisi diletakkan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x lalu hitung jumlah leukosit. Hasil perhitungan dikalikan 50 (Fadiah *et al.*, 2022).

3.5 Analisis Data

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

3.6 Kerangka Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Penelitian