

BAB III

METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Optik Jurusan Biologi Fakultas Sains Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dengan rentang waktu bulan Januari hingga Mei 2017.

3.2 Variabel Penelitian

Pada penelitian yang akan dilaksanakan di Laboratorium Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim menggunakan variabel bebas yaitu jumlah kerusakan sel darah. Sedangkan untuk variabel terikat yaitu jumlah semprotan, waktu penyemprotan, jumlah pemberian antioksidan.

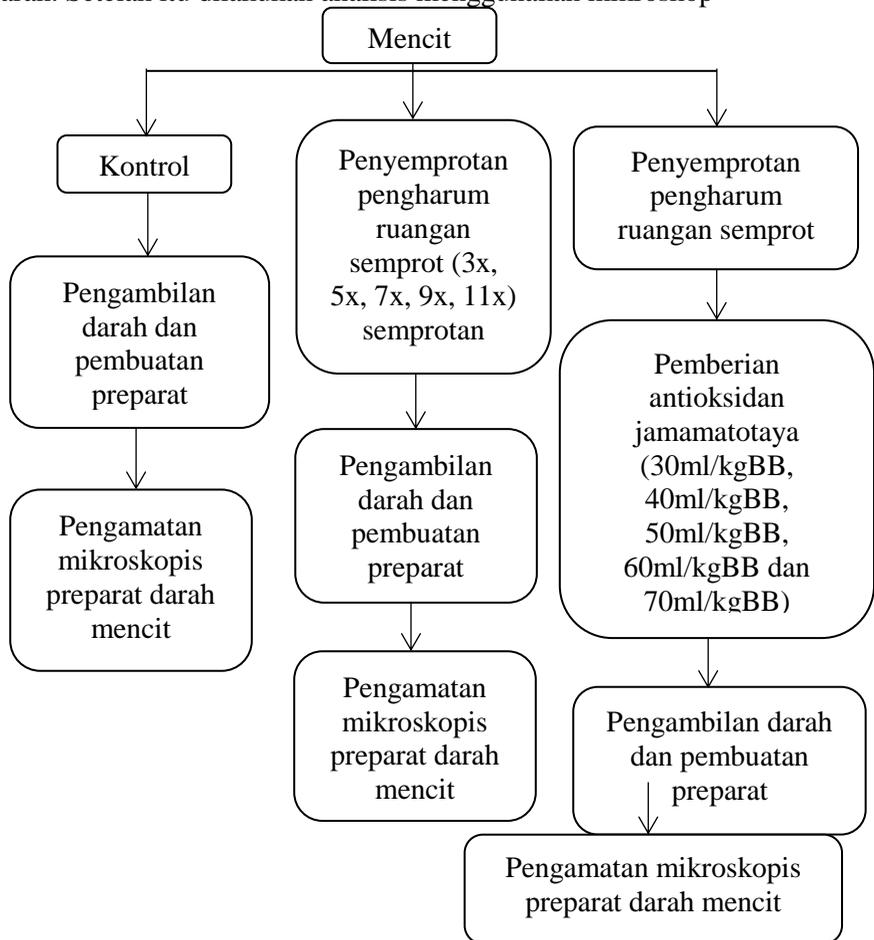
3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan terdiri dari chamber atau wadah kecil dengan ukuran 40cmx30cm, timbangan digital, mikroskop, seperangkat alat bedah, seperangkat alat-alat preparasi termasuk masker dan sarung tangan. Sedangkan bahan yang digunakan terdiri dari pengharum ruangan semprot, mencit, buah jambu biji merah, buah mangga, madu, buah tomat, sayur tauge, buah pepaya, gymsa, alkohol dan aquades, Methanol.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi beberapa tahapan yaitu persiapan bahan dan alat, pengelompokan mencit menjadi tiga kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 mencit yaitu kelompok 1 (K) sebagai kontrol sehat, kelompok 2 (K-) sebagai kelompok paparan yaitu mencit disemprot pengharum ruangan dengan dosis 3x semprotan, 5x semprotan, 7x semprotan, 9x semprotan dan 11x semprotan, sebelum dan sesudah penyemprotan dilakukan penimbangan pengharum ruangan menggunakan timbangan digital untuk mengetahui berapa banyak jumlah pengharum ruangan yang disemprotkan pada setiap penyemprotan, pada penyemprotan ini hanya dilakukan penyemprotan tanpa pemberian antioksidan, kelompok 3 (K+) mencit disemprot pengharum ruangan sesuai dengan dosis efektif yang telah didapatkan dari kelompok (K-) yakni sebesar 9x semprotan, sama seperti pada tahap pertama sebelum dan setelah penyemprotan dilakukan penimbangan pengharum ruangan dengan menggunakan timbangan digital agar dapat diketahui berapa

banyak jumlah pengharum ruangan yang sudah disemprotkan, kemudian diberi antioksidan sebesar 30ml/kgBB, 40ml/kgBB, 50ml/kgBB, 60ml/kgBB, dan 70ml/kgBB. Pada perlakuan tahap 1 mencit diaklimatisasi selama 7 hari kemudian diberi perlakuan yakni pemberian dosis semprot selama 14 hari kemudian pada hari ke lima belas dilakukan pembedahan dan pembuatan preparat, setelah itu dianalisis untuk mendapatkan dosis efektif dari penyemprotan pengharumruangan. Pada tahap 2 mencit disemprot dengan dosis efektif yang sudah di dapat pada tahap pertama dan diberi antioksidan dengan dosis 30ml/kgBB, 40ml/kgBB, 50ml/kgBB, 60ml/kgBB dan 70ml/kgBB selama 14 hari. Setelah perlakuan selesai, pada hari kelima belas hewan percobaan diambil darahnya dan dibuat preparat darah. Setelah itu dilakukan analisis menggunakan mikroskop



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.4.1 Persiapan Bahan dan Alat

Tahapan yang dilakukan pada penelitian yang pertama yakni sampel mencit 55 ekor dibagi menjadi 2 tahapan penelitian, tahap 1 terdiri atas 6 kelompok dan tahap 2 terdiri atas 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor mencit. Setelah itu, dilakukan adaptasi di Laboratorim Fisiologi Hewan UIN Malang selama tujuh hari. Selanjutnya dilakukan persiapan penyemprotan pengharum ruangan dengan memasukkan mencit kedalam chamber, proses penyemprotan dilakukan selama 14 hari selama 20 menit. Sebagai perlakuan tahap 1, untuk menentukan dosis efektif penyemprotan, lalu dilakukan pembedahan, pembuatan preparat dan pengamatan secara mikroskopis. Setelah itu pada tahap kedua mencit diberi antioksidan berupa jamamatotaya sesuai dengan dosis yang telah ditentukan yakni sebesar, 30ml/kgBB, 40ml/kgBB, 50ml/kgBB, 60ml/kgBB dan 70ml/kgBB. Selanjutnya dilakukan pembuatan preparat darah mencit. Setelah pembuatan preparat selesai, dilakukan pengamatan mikroskopis darah mencit dengan mikroskop.

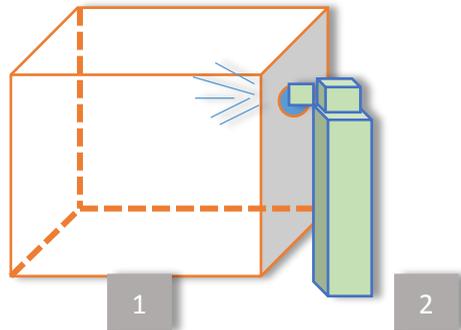
3.4.2 Pengadaptasian Hewan Coba

Hewan coba yang dilakukan adalah mencit jantan sebanyak 55 ekor. Mencit yang digunakan mempunyai umur 6-8 minggu dengan berat badan 20-30 gram. Pengadaptasian mencit dilakukan selama tujuh hari dengan diberi makan dan minum secara teratur.

3.4.3 Penyemprotan Hewan Coba

Proses penyemprotan hewan coba mencit dilakukan setelah mencit dilakukan pengadaptasian selama tujuh hari. Proses penyemprotan mencit dilakukan satu hari satu kali selama 14 hari. Pada proses penyemprotan, mencit pada masing-masing kelompok dimasukkan kedalam chamber penyemprotan kemudian ditutup dan disemprot dengan pengharum ruangan dengan dosis 3x, 5x, 7x, 9x, dan 11x semprot setiap hari dalam setiap kelompok. Sebelum dan sesudah dilakukan penyemprotan, pengharum ruangan ditimbang

dengan menggunakan timbangan digital hal ini dilakukan dengan tujuan agar diketahui seberapa banyak jumlah pengharum ruangan yang disemprotkan. Penyemprotan dilakukan dengan cara menyemprotkan pengharum ruangan semprot ke dalam chamber yang berisi mencit pada chamber. Lama penyemprotan sekitar 20 menit, setelah 20 menit tutup chamber dibuka dan mencit dikeluarkan lalu dikembalikan ke kandang.



Gambar 3.2 Rangkaian alat penelitian.

Keterangan :

1. *Vacuum chamber*
2. *Airfreshener spray*

3.4.4 Pemberian Antioksidan

Antioksidan yang digunakan adalah jamamatotaya yakni singkatan dari jambu merah, mangga, madu, tomat, tauge dan pepaya. Pemberian antioksidan dilakukan setelah mencit disemprot pengharum ruangan sesuai dosis efektif yang diperoleh dari tahap ke 1, pemberian antioksidan dilakukan selama 14 hari. Dengan variasi dosis 30ml/kgBB, 40ml/kgBB, 50ml/kgBB, 60ml/kgBB dan 70ml/kgBB sesuai dengan ketentuan. Antioksidan dibuat dengan cara diblender menjadi satu dengan tambahan air aquades. Antioksidan jamamatotaya dimasukkan kedalam mulut mencit dengan cara sonde menggunakan suntikan.



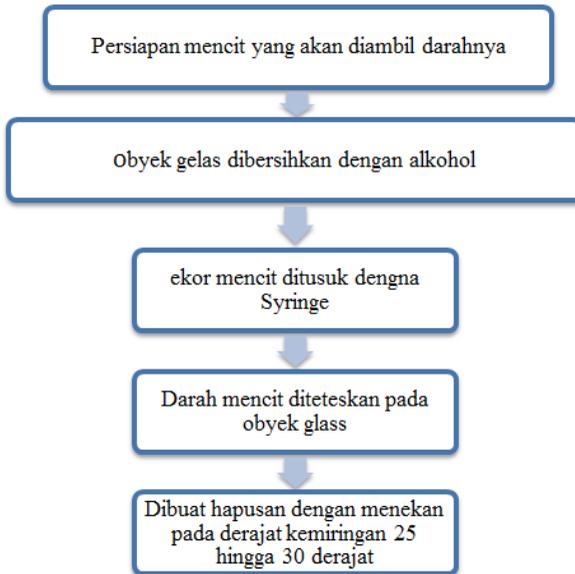
Gambar 3.3 Sonde Mencit

3.4.5 Perlakuan Pengambilan Darah

Darah mencit diambil 20% dari total volume darah, yaitu 3 mL dari total volume darah 15 mL dengan selang waktu 2 minggu untuk perlakuan berikutnya. Untuk meningkatkan vasodilatasi ketika darah diambil, maka mencit diletakkan di dalam ruang dengan suhu 40°C selama 10 sampai dengan 15 menit.

Pengambilan sampel darah tikus, yaitu dengan cara sebagai berikut. Pertama, tikus dikeluarkan dari kandang dengan cara setengah bagian dari ekornya diangkat, kemudian mencit dimasukkan ke sungkup rangkap. Pada bagian ujung dari ekor mencit diolesi dengan alcohol 70%. Pada ekor ditusuk dengan alat Syringe 3 mL. darah dari ekor mencit kemudian dikeluarkan secara bertahap dan perlahan dengan cara menekan pangkal ekor, kemudian diurut hingga ke pangkal ekor. Darah yang keluar pertama harus dibuang, kemudian darah ditampung sesuai kebutuhan. Terakhir, ekor tikus diolesi dengan betadin agar tidak terinfeksi dan dikembalikan pada kandang.

Alur pengambilan darah



Gambar 3.4 Diagram alur pengambilan darah

3.5 Perhitungan Kerusakan Darah

$$\text{Jumlah eritrosit per mm}^3 = Y \times 400 \times \frac{100}{80} = 5000 Y$$

Keterangan:

Y = jumlah eritrosit yang terhitung 400

= 80 bujur sangkar yang digunakan dikalikan lima (bagian bujur sangkar sisi seperlima)

100 = pengenceran darah

80 = 16 bujur sangkar (dengan sisi 1/20 mm) sebanyak 5 daerah.

Jumlah eritrosit diketahui dari eritrosit yang berada di dalam 5 bilik hitung daerah R. Perhitungan dimulai pada sebelah kiri secara zigzag untuk menghindari perhitungan yang kurang tepat eritrosit yang berada di garis batas sebelah kiri.

$$\text{Prosentase kerusakan darah} = \frac{\text{Jumlah kerusakan eritrosit}}{\text{Total jumlah darah}} \times 100\%$$

3.6 Identifikasi Kerusakan

Identifikasi kerusakan menggunakan aplikasi image raster dimana pada setiap lapang pandang satu persatu sel darah diberikan

label, dimana label diberikan untuk sel normal, serta untuk setiap jenis kerusakan sel darah yang diakibatkan oleh pengharum ruangan. Lapang pandang didapatkan dari setiap preparat yang diambil gambarnya dengan mikroskop pada perbesaran 500x, pengambilan gambar pada setiap preparat dilakukan dengan ketentuan, pojok kiri atas, pojok kanan atas, bagian tengah, pojok kiri bawah, serta pojok kanan bawah pada setiap preparat, jadi pada setiap preparat diambil 5 gambar lapang pandang.

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan menggunakan korelasi antara pemberian pengharum ruangan dengan mencit tanpa diberi antioksidan jamamatotaya dan pemberian pengharum ruangan dengan mencit diberi antioksidan jamamatotaya terhadap eritrosit mencit.