

## BAB III

## MATERI DAN METODA PENELITIAN

III.1. Tempat dan lama penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dimulai pada 13 Maret 1989 dan berakhir pada 23 Maret 1989.

III.2. Binatang Percobaan

Binatang percobaan yang digunakan adalah mencit betina sehat galur AJS, berumur 8 minggu dengan berat badan antara 25 gram sampai 27 gram, sebanyak 100 ekor. Mencit ini berasal dari Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya. Sebagai pakan mencit digunakan Par-G produksi PT. Comfeed. Kandang mencit yang digunakan sebanyak 10 buah, masing-masing berukuran  $40 \times 30 \times 20 \text{ cm}^3$ . Bagian dasarnya diberi alas sekam padi.

III.3. Bahan dan Peralatan Penelitian

3.a. Bahan utama penelitian ini adalah Vitamin C injeksi produksi DUPA, Reg.D. 2018281, berkonsentrasi 100 mg setiap mililiter, berbentuk larutan tidak berbau dan berwarna putih jernih.

3.b. Bahan pembantu penelitian ini terdiri dari :

-Karbon koloidal, yang dibuat dengan mencampurkan 40 ml tinta cina Pelikan no. 22 A 309 buatan Jerman, yang mengandung 3,2 gram karbon (seti-

ap mililiter mengandung 80 mg karbon) dengan - 400 mg gelatin yang telah dilarutkan dalam 40-ml NaCl 0,9 % steril. Kemudian larutan ini dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditam- bahkan NaCl 0,9 % steril sampai batas 100 ml . Pada pengenceran ini konsentrasi karbon menjadi 32 mg setiap mililiter (2).

-Larutan PBS (Phosphat Buffer Saline).

-Aquadest steril.

-Heparin.

-Alkohol 70 %.

3.c. Peralatan penelitian ini terdiri dari :

-Spektrofotometer "Spectronic 20" buatan Bausch dan Lomb.

-Tabung hemolisis 5 ml + rak

-Pipet hematokrit berskala

-Spuit tuberkulin 1 ml

-Spuit 10 ml

-Gelas ukur

-Labu ukur 100 ml, 200 ml

-Gelas erlenmeyer

-Stop watch

-Timbangan cent-o-gram O Haus

-Kapas dan kertas penghisap.

### III.4. Prosedur Penelitian

4.a. Pengelompokan hewan percobaan

Hewan percobaan dibagi menjadi 10 kelompok secara acak, terdiri dari :

- Lima kelompok obat : A, B, C, D dan E.
- Lima kelompok kontrol : A', B', C', D' dan E'.

4.b. Untuk masing-masing kelompok obat pada hari ke-0(nol) disuntik secara intramuskular dengan Vitamin C dosis terapi 12,5 mcg/g berat badan dalam volume 0,1 mililiter. Sedangkan kelompok kontrol pada hari ke 0(nol) disuntik secara intramuskular dengan larutan PBS sebanyak 0,1 ml.

4.c. Uji "Carbon Clearance"

- Kelompok A dan A' diuji pada hari ke 1 (24 jam setelah perlakuan), kelompok B dan B' pada hari ke 3, kelompok C dan C' pada hari ke 5, kelompok D dan D' pada hari ke 7 dan kelompok E dan E' pada hari ke 9.
- Pada uji "Carbon Clearance", dosis karbon koloidal yang disuntikkan intravena adalah 16 mg/100 g berat hidup mencit. Kemudian setiap 2 menit sampai menit ke 12, tiap mencit diambil darahnya sebanyak 0,025 ml menggunakan pipet berskala setelah dicuci heparin.
- Untuk semua mencit, sesaat sebelum karbon koloidal disuntikkan, diambil dulu darahnya sebanyak 0,025 ml dan dihemolisis di dalam aquadest steril, sebagai blanko peneraan spektrofotometer pada angka 0(nol).

- Pengambilan darah pada mencit melalui plexus-venosus retroorbitalis, sedangkan penyuntikan intravena melalui vena ekor.
- Pada tiap sampel darah yang telah diambil, dihemolisis secara terpisah di dalam 2 ml aqua-dest steril. Kemudian diukur daya absorpsinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 630 nanometer. Hasil pengukuran tersebut dibandingkan dengan standar karbon (kurva baku).
- Evaluasi sistem fagositosis dilakukan dengan cara menghitung Indeks Fagositosis (K) sebagai berikut:

$$K = \frac{\text{Log } C_{2'} - \text{Log } C_{12'}}{T_{12'} - T_{2'}}$$

Keterangan :

K = Konstanta eliminasi karbon dari darah oleh sel-sel fagosit dalam fungsi waktu.

$C_{2'}$  dan  $C_{12'}$  = konsentrasi karbon dalam darah, dinyatakan dalam mg/ml pada jarak waktu 2 menit sampai menit ke 12.

$T_{12'}$  dan  $T_{2'}$  = saat pengambilan darah yang dinyatakan dalam menit.

- 4.d. Kurva baku (standar karbon) dari konsentrasi - karbon, dibuat dengan cara membuat pengenceran-larutan karbon berkonsentrasi : 0,2 ppm, 0,4 ppm, 0,6 ppm, 0,8 ppm, 1,0 ppm, 1,2 ppm, 1,4 ppm, 1,6-

ppm, 1,8 ppm, 2,0 ppm, 2,2 ppm, 2,4 ppm, 2,6 ppm, 2,8 ppm, 3,0 ppm, 3,2 ppm, 3,4 ppm, 3,6 ppm, 3,8-ppm dan 4,0 ppm. Standar karbon ini diukur daya absorpsinya dengan spektrofotometer dan panjang gelombang yang sama.

4.e. Cara pembuatan kurva baku untuk peneraan pada - spektrofotometer sebagai berikut :

- Masing-masing pengenceran larutan karbon yang telah diketahui konsentrasinya seperti di atas, diambil 2 ml kemudian ditambahkan 0,025 ml darah mencit.
- Sebagai blanko, diambil 2 ml aquadest steril- kemudian ditambahkan 0,025 ml darah mencit.

### III.5. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (Completely Random Design). Data hasil penelitian dianalisis dengan metoda Analisis Varian F (Anava F). Jika dengan pengujian Anava F terdapat perbedaan nyata atau sangat nyata, maka - data tersebut akan diuji lebih lanjut dengan metoda Uji Jarak Duncan pada taraf kepercayaan 5 %. (63,64).