

**PETUNJUK PRAKTIKUM
FISIOLOGI HEWAN EKSPERIMENTAL**

(PP/BIO/FHE/01/R0)



Disusun Oleh :

Haris Setiawan, M.Sc.

Rita Maliza, M.Si., Ph.D.

Sri Wijayanti Wulandari, M.Sc.

**LABORATORIUM STRUKTUR DAN FISIOLOGI HEWAN
PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI TERAPAN
UNIVERSITAS AHMAD DAHLAN**

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah buku petunjuk praktikum Fisiologi Hewan ini telah selesai direvisi dengan tujuan untuk menyempurnakan buku petunjuk sebelumnya.

Petunjuk praktikum Fisiologi Hewan Eksperimental ini disusun sebagai panduan bagi mahasiswa/praktikan dalam melaksanakan seluruh prosedur terkait kegiatan praktikum fisiologi hewan eksperimental. Diharapkan setelah selesai menempuh praktikum ini, mahasiswa memahami dengan baik keseluruhan proses-proses faal tubuh dan faktor-faktor yang mempengaruhi proses tersebut. Mahasiswa juga diharapkan menjadi terampil dalam menggunakan berbagai alat yang berhubungan dengan proses praktikum fisiologi hewan eksperimental.

Buku Petunjuk Praktikum ini disusun sebaik mungkin dengan menyesuaikan segala sarana dan prasarana yang terdapat di laboratorium guna lebih menunjang perkuliahan Fisiologi Hewan Eksperimental.

Sebelum menjalankan praktikum, para mahasiswa diharuskan melakukan persiapan yang baik dan menaati segala instruksi yang terdapat dalam buku petunjuk ini.

Penyusun

DAFTAR ISI

Kata Pengantar	i
Daftar Isi	ii
Tata Tertib Praktikum Fisiologi Hewan Eksperimental	iii
Percobaan 1. Penanganan Hewan Coba	1
Percobaan 2. Pemberian Label dan Nama Kandang Hewan Uji	8
Percobaan 3. Penimbangan Bobot Badan dan Pengamatan Hewan Uji	14
Percobaan 4. Teknik Pengambilan Darah	16
Percobaan 5. Pemisahan Serum Darah	19
Percobaan 6. Pembuatan Hewan Model Diabetes Melitus (DM)	21
Percobaan 7. Pembekuan Darah (Koagulasi)	25
Percobaan 8. Perhitungan Kadar Hemoglobin	28
Percobaan 9. Teknik Apusan Darah (Hemogram)	31
Percobaan 10. Menghitung Jumlah Eritrosit dan Jumlah Leukosit	33
Percobaan 11. Uji Hematologi Lengkap	36
Percobaan 12. Analisis Sperma	39
Percobaan 13. Uji Toksisitas BSLT	42
Referensi	47

TATA TERTIB

PRAKTIKUM FISILOGI HEWAN EKSPERIMENTAL

A. Tata Tertib Praktikum

1. Memahami acara-acara pratikum, pratikan harus sudah mempelajari terlebih dahulu asistensi mengenai percobaannya dan kuliah yang ada hubungannya dengan percobaan itu.
2. Pratkan harus sudah datang paling lambat 10 menit sebelum kegiatan pratikum dimulai.
3. Setiap kelompok harus lengkap anggotanya, kecuali ada izin yang sah dari wali/orang tua atau sedang sakit.
4. Selama pratikum, pratikan harus mengenakan jas praktikum. Jika diinstruksikan, praktikan wajib memakai sarung tangan laboratorium (*lab gloves*)
5. Patuh terhadap petunjuk-petunjuk asisten dan dosen koordinator praktikum
6. Selama menjalankan pratikum, praktikan bertanggung jawab penuh atas alat-alat yang digunakan; jika merusak/memecahkan alat maka wajib melaporkan pada asisten dan hal ini merupakan tanggung jawab kelompok.
7. Selesai praktikum, praktikan harus membersihkan alat yang digunakan, kemudian menyerahkan kembali pada asisten.
8. Blangko laporan sementara hari itu harus diperiksakan kepada asisten untuk ditandatangani.
9. Menyerahkan laporan paling lambat satu minggu sesudah pratikum.
10. Menempuh responsi dengan syarat telah menyelesaikan semua acara praktikum yang ditentukan dan telah menyerahkan semua laporan.
11. Surat izin jika berhalangan hadir, harus diserahkan pada hari itu, kecuali bila sakit paling lambat enam hari sesudah pratikum.

B. Praktikan Tidak Diperkenankan

1. Merokok, makan dan minum di dalam ruang praktikum.
2. Mengotori meja pratikum, ruang praktikum atau sengaja bermain-main terhadap alat-alat laboratorium.
3. Bersenda gurau sehingga mengganggu ketenangan dan ketertiban, baik dalam kelompok sendiri maupun kelompok lain.

PERCOBAAN 1

PENANGANAN HEWAN COBA

A. Tujuan

Praktikum ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui jenis-jenis hewan coba dalam penelitian fisiologi hewan.
2. Mempelajari teknik perlakuan zat uji, anestesi dan eutanasi hewan coba (rodensia).

B. Dasar teori

1. Pengenalan Hewan Coba

Hewan yang menjadi obyek penelitian di bidang biologi beraneka ragam, mulai dari hewan tingkat rendah (avertebrata) bahkan hewan satu sel sampai dengan hewan tingkat tinggi (vertebrata). Pada penelitian yang bertujuan untuk dapat diaplikasikan pada manusia umumnya digunakan hewan dari kelompok kelas yang sama dengan manusia yaitu mammalia. Hewan percobaan tingkat pertama umumnya dari golongan rodensia dan ungags, tahap selanjutnya dapat digunakan hewan-hewan dari golongan ruminansia. Hewan percobaan yang paling tinggi adalah dari kelompok primate. Beberapa jenis hewan coba yang umum digunakan dalam penelitian bidang fisiologi hewan adalah:

a. Mencit (*Mus musculus L.*)

Badan mencit berukuran kecil, ketika berumur 4 minggu beratnya sekitar 18-20 gram dan ketika dewasa beratnya dapat mencapai 35 gram. Mencit laboratorium adalah jenis albino, berwarna putih bersih dan bermata merah.

Tabel 1. Data biologi normal mencit (*Mus musculus L.*)

Konsumsi pakan per hari	5 g (umur 8 minggu)
Konsumsi air minum per hari	6,7 ml (umur 8 minggu)
Diet protein	20-25%
Ekskresi urine per hari	0,5-1 ml
Lama hidup	1,5 tahun
Bobot badan dewasa (jantan dan betina)	20-40 g
Bobot lahir	1-1,5 g
Dewasa kelamin (jantan=betina)	28-49 hari
Siklus estrus (menstruasi)	4-5 hari (polyestrus)
Umur sapih	21 hari
Mulai makan pakan kering	10 hari
Rasio kawin	1 jantan – 3 betina
Jumlah kromosom	40
Suhu rektal	37,5°C
Laju respirasi	165 X/mm
Denyut jantung	310-840 X/mm
Pengambilan darah maksimum	7,7 ml/kg
Jumlah sel darah merah (eritrosit)	8,7-10,5 X 10 ⁶ /µl

Kadar haemoglobin (Hb)	13.4 g/dl
<i>Pack Cell Volume</i> (PVC)	44%
Jumlah sel darah putih (leukosit)	8,4 X 10 ³ /ul

b. Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769)

Tikus laboratorium berukuran lebih besae daripada mencit. Pada umur 4 minggu beratnya berkisar antara 40-50 gram dan ketika dewasa beratnya dapat mencapai 300 gram. Dibandingkan dengan tikus liar, tikus laboratorium lebih cepat mencapai dewasa dan mudah berkembang biak.

Tabel 2. Data biologi normal tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769)

Konsumsi pakan per hari	5 g/100 g bb
Konsumsi air minum oer hari	8-11 ml/100 g bb
Diet protein	12%
Ekskresi urine per hari	5,5 ml/100 g bb
Lama hidup	2,5-3 tahun
Bobot badan dewasa	
a. Jantan	300-400 g
a. Betina	250-300 g
Bobot lahir	5-6 g
Dewasa kelamin (jantan=betina)	50+10 hari
Siklus estrus (menstruasi)	5 hari (polyestrus)
Umur sapih	21 hari, 40-50 g
Mulai makan pakan kering	12 hari
Rasio kawin	1 jantan – 3 atau 4 betina
Jumlah kromosom	42
Suhu rektal	37,5 ^o C
Laju respirasi	85 X/mm
Denyut jantung	300-500 X/mm
Pengambilan darah maksimum	5,5 ml/kg
Jumlah sel darah merah (eritrosit)	7,2-9,6 X 10 ⁶ /ul
Kadar haemoglobin (Hb)	15,6 g/dl
<i>Pack Cell Volume</i> (PVC)	46%
Jumlah sel darah putih (leukosit)	14 X 10 ³ /ul

c. Marmot (*Cavia* sp.)

Marmot tidak mempunyai ekor menonjol. Tidak seperti anak mencit dan tikus, ketika lahir tubuh anak marmot sudah diliputi rambut dan mata sudah mulai membuka. Hewan ini kurang baik untuk penelitian immunologi karena memiliki respon imun yang kurang sensitive.

d. Kelinci (*Nesolagus* sp.)

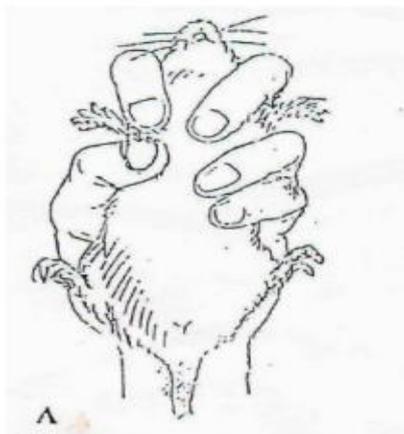
Kebalikan dengan marmot, kelinci sangat baik untuk hewan percobaan di bidang immunologi karena memiliki respon imun sangat sensitive. Hewan ini banyak digunakan untuk membuat antiserum yang sangat penting dalam pelaksanaan uji immunodiagnostic.

Selain hewan-hewan tersebut di atas masih ada beberapa jenis hewan yang digunakan dalam penelitian misalnya hamster, gerbil, ungags, dsb. Ayam dapat

digunakan yang baru saja menetas yang dikenal sebagai DOC (*day-old chick*) maupun yang dara atau dewasa. Ungags sangat baik untuk penelitian di lingkup endokrinologi, biologi, reproduksi dan perkembangan.

2. Penanganan Hewan Coba

Penanganan hewan coba membutuhkan teknik khusus supaya hewan tersebut tidak memberontak. Kesalahan penanganan mengakibatkan hewan stress sehingga data yang dihasilkan tidak valid dan juga dapat melukai peneliti misalnya digigit atau dicakar. Salah satu teknik memegang tikus ditunjukkan pada **gambar 1a**.



(a)



(b)

Gambar 1. Teknik memegang tikus (a). perlakuan zat uji menggunakan sonde (b). (Refdanita *et al.*, 2018).

3. Perlakuan (Rute Administrasi) Zat Uji

Perlakuan hewan uji dapat dilakukan dengan berbagai cara tergantung tujuan penelitian dan sifat (fisika dan kimia) zat yang akan diperlakukan. Beberapa cara yang sering dilakukan antara lain:

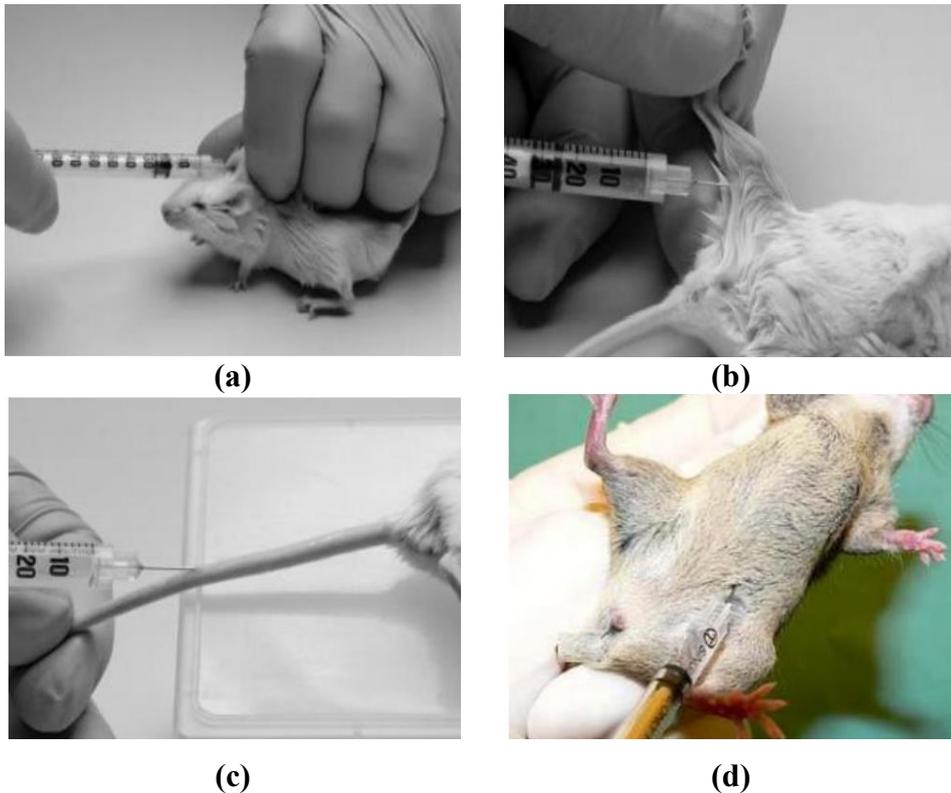
a. Enternal

Perlakuan terhadap hewan coba dengan memasukan zat uji melalui saluran pencernaan. Dapat dilakukan dengan mencampurkan zat tersebut dengan makanan/minuman (*per oral*) atau dengan menggunakan jarum kanul/sonde (*oral gavage*). Perlakuan zat uji menggunakan sonde ditunjukkan **gambar 1b**.

b. Par enternal

Perlakuan terhadap hewan coba dengan memasukan zat uji selain melalui saluran pencernaan yang dapat dilakukan dengan beberapa cara, ditunjukkan pada **gambar 2a-d**.

- 1) **Subkutan (suntikan bawah kulit, S.C)**, perlakuan zat uji dengan menyuntikan zat tersebut di bawah kulit area punggung atau perut.
- 2) **Intra muscular (I,M)**, perlakuan zat uji dengan cara menyuntikan zat tersebut pada otot tungkai atas depan atau belakang.
- 3) **Intra vena (I.V)**, perlakuan zat uji dengan menyuntikan zat tersebut ke dalam vena lateralis ekor.
- 4) **Intraperitoneal (I.P)**, perlakuan zat uji dengan menyuntikan zat tersebut pada di daerah abdomen diantara kartilago xiphoidea dan simphisis pubis.



Gambar 2. Rute administrasi zat uji pada hewan uji secara sub kutan (a), intra muskular (b), intra vena (c), dan intra peritoneal (d). (Refdanita *et al.*, 2018).

4. Metode Anestesi

Anestesi (pembiusan) bertujuan untuk mengurangi rasa sakit hewan coba yang akan diperlakukan, memudahkan penanganan hewan coba dan meningkatkan keselamatan peneliti. Beberapa teknik yang umum digunakan antara lain:

a. Ether/kloroform

Biasanya zat ini diberikan secara inhalasi dalam wadah tertutup. Hewan diletakkan ke dalam suatu wadah yang biasa disebut *killing bottle*. Kapas dibasahi ether/kloroform kemudian dimasukkan ke dalam wadah tersebut lalu wadah ditutup

dan ditunggu beberapa saat hingga terjadi anestesi. Penggunaan ether/kloroform mulai ditinggalkan, kecuali kondisi tertentu.

b. Barbiturat

Jenis barbiturate yang umum digunakan adalah *pentobarbital*. Untuk anestesi mencit dosisnya 35 mg/kg bb **i.v.** atau 50 mg/kg bb **i.p.** untuk tikus dosisnya 100 mg/kg bb secara **i.p.**

c. Ketamine (*kethamine* HCl)

Ketamin biasanya digunakan bersamaan dengan xylazine (*cocktail*) untuk mendapatkan efek sedatif dan analgesik yang cukup. Anestesi menggunakan ketamin (*single dose*) dilakukan dengan cara injeksi *intramuscular* pada otot tungkai belakang atau depan. Dosis yang digunakan adalah 40 s/d mg/kg berat badan.

5. Metode Euthanasi

Eutanasi adalah mengakhiri hidup hewan coba dengan cepat yang bertujuan untuk mengakhiri penderitaan hewan coba yang terpapar zat uji dalam jangka waktu lama atau untuk pengamatan organ dalam. Penentuan metode eutanasi berdasarkan jenis, ukuran, dan jumlah hewan coba. Eutanasi mencit dapat dilakukan dengan cara memutus sumsum belakang, atau disebut **dislokasi leher**. Caranya dengan menekan kepala mencit menggunakan ibu jari dan jari telunjuk, kemudian dilakukan penarikan ekor dengan kuat dan tiba tiba. Jika jumlah mencit banyak, lebih mudah digunakan gas karbondioksida (CO₂) yang ditempatkan dalam wadah plastik atau logam. Cara ini juga cocok untuk tikus. Untuk tikus yang besar sebaiknya digunakan alat dekapitasi. Eutanasi juga dapat dilakukan dengan zat kimia yakni menggunakan barbiturat atau dengan overdosis ketamin.

C. Alat dan Bahan :

1. Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769)
2. Mencit (*Mus musculus* L.)
3. Ether/kloroform
4. Pakan tikus
5. Kandang tikus/mencit dan botol minum
6. Sekam
7. Jarum kanal/sonde
8. Akuades

D. Cara Kerja

Praktikum ini dibagi menjadi beberapa tahap:

1. Penanganan hewan coba

- a. Pastikan hewan coba yang akan digunakan telah diaklimatisasi pada kondisi laboratorium
- b. Lakukan familiarisasi hewan coba dengan meletakkan telapak tangan pada tutup kandang sehingga hewan coba mampu mengendus.
- c. Pindahkan tikus/mencit dari kandang dengan menarik 1/3 bagian pangkal ekor.
- d. Selanjutnya tikus dicengkram dengan tangan pada bagian kraniodorsal, kepala tikus dijepit di antara jari tengah dan jari telunjuk, sedangkan dua tungkai depan tikus dijepit dengan jari yang lain.
- e. Mencit dipegang (*restrain*) dengan menarik (mencubit) lipatan kulit tengkuk, kemudian ekor dijepit dengan jari kelingking.
- f. Marmot dipegang badannya menggunakan dua tangan.

2. Mencukur Hewan Uji

Pencukuran rambut dilakukan pada saat hewan coba dalam keadaan sadar.

- a. Tikus/mencit dipegang pada bagian kepala dengan tangan kiri.
- b. Selanjutnya tangan kanan memegang alat cukur.
- c. Cukur rambut tikus pada bagian yang punggung dengan lebar yang diinginkan hingga bersih (jangan terlalu ditekan karena akan melukai kulit tikus).

3. Anestesi

- a. Timbang hewan coba untuk menentukan volume ketamin yang akan diinjeksikan.
- b. Lakukan konversi dosis ketamine (50 mg/Kg bb) sesuai konsentrasi ketamin yang digunakan dan berat badan hewan coba.
- c. Encerkan sediaan ketamin tersebut (misal 0,1 ml ketamin ditambah 0,4 ml akuades) kemudian injeksikan secara intramuskular menggunakan jarum ukuran 27 G.

4. Perlakuan zat uji

Adminisrasi zat uji (akuades) dengan lima macam rute administrasi yang telah dijelaskan pada dasar teori. Setiap kelompok praktikan melakukan administrasi zat uji dengan rute yang berbeda sesuai pembagian oleh asisten praktikum.

a. *Oral gavage*

- 1) Hewan coba dipegang dengan teknik yang telah dijelaskan (poin 1).
- 2) Masukkan zat uji menggunakan *syringe* dengan ujung jarum kanul/sonde ke dalam kerongkongan melalui rongga mulut hingga mencapai lambung.

b. Sub kutan

- 1) Lipatan kulit pada bagian tengkung ditarik dengan ibu jari dan telunjuk.
- 2) Injeksikan zat uji pada ruang di bawah kulit tikus menggunakan jarum ukuran 27 G.

c. Intra vena

- 1) Hewan coba dipegang dengan teknik yang telah dijelaskan (poin 1).
- 2) Ekor tikus terlebih dahulu dibebat dengan kain hangat untuk memudahkan penentuan letak vena lateral ekor.
- 3) Apabila vena tersebut belum terlihat, maka pangkal ekor dapat diikat sementara waktu hingga vena terlihat jelas.
- 4) Bersihkan ekor tikus dengan cairan antiseptik (etanol 70%)
- 5) Injeksikan zat uji pada vena tersebut menggunakan jarum ukuran 27 G dengan ujung searah kranial.

d. Intra muscular

- 1) Hewan coba dipegang dengan teknik yang telah dijelaskan (poin 1).
- 2) Injeksikan zat uji pada otot tungkai depan atau belakang tikus dengan jarum ukuran 27 G.

5. Eutanasi (terminasi)

Eutanasi dilakukan pada saat hewan coba berada dalam pengaruh agen anestesi.

a. Dislokasi leher

- 1) Tikus/mencit dipegang pada bagian kepala dan ekor dengan tangan yang lain.
- 2) Selanjutnya tarik kedua bagian tersebut ke arah berlawanan dengan cepat hingga terdengar bunyi.
- 3) Tahan posisi tersebut kira kira 10 detik kemudian dilepaskan.
- 4) Kematian tikus dipastikan dengan ketiadaan reaksi ketika kulit tikus dicubit.

b. Eksanguinasi

- 1) Bedah tikus/mencit pada bagian abdomen.
- 2) Organ organ viseral disingkirkan hingga terlihat vena cava pada daerah dorsomedial tubuh.
- 3) Hisap darah dari vena cava menggunakan *syringe* dengan jarum ukuran 23 G hingga mencapai lebih dari 2/3 volume total darah hewan coba tersebut.
- 4) Hewan coba akan segera mati karena mengalami *shock hypovolemic*.

PERCOBAAN 2

PEMBERIAN LABEL DAN NAMA KANDANG HEWAN UJI

A. Tujuan

1. Mahasiswa memahami dan mampu memberikan label terhadap hewan uji secara mandiri.
2. Mahasiswa memahami dan mampu menulis label kandang hewan uji secara mandiri.

B. Dasar Teori

1. Pemberian label Hewan Uji

Hewan percobaan adalah setiap hewan yang dipergunakan pada sebuah penelitian biologis dan biomedis yang dipilih berdasarkan syarat atau standar dasar yang diperlukan dalam penelitian. Dalam suatu percobaan, masing-masing hewan harus diidentifikasi atau ditandai untuk membedakannya. Penandaan hewan dapat dibagi menjadi dua jenis yaitu penanda permanen dan penanda jangka pendek. Dasar dilakukan penandaan hewan uji adalah bentuk karakteristik hewan satu spesies yang identik dan mempunyai identitas yang sama dengan demikian dilakukan penandaan terhadap hewan uji. Penandaan hewan uji dapat dilakukan dengan beberapa cara:

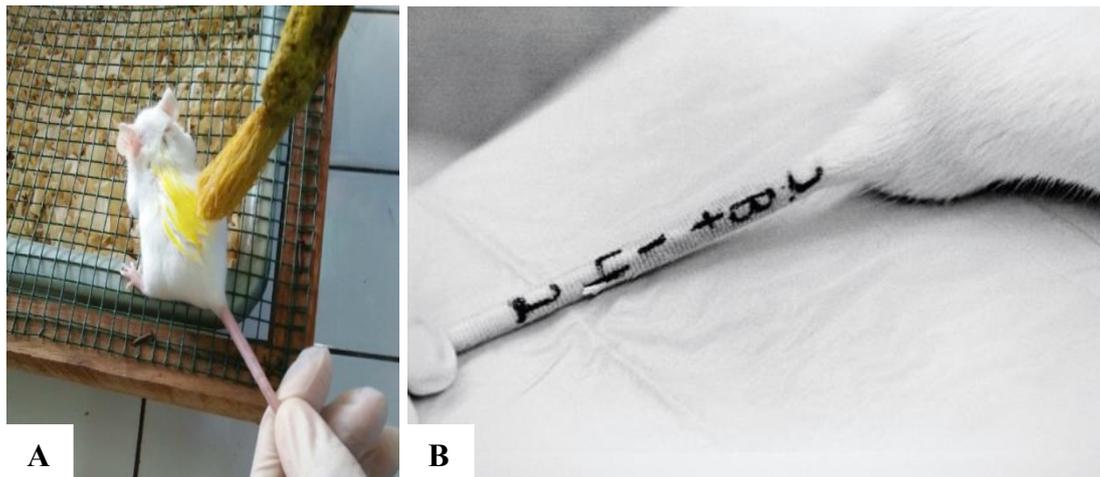
1. Diberi tanda pewarnaan pada bulu (dengan asam pikrat) tata letak pada bagian tubuh tertentu.
2. Tanda pada ekor berdasarkan tata nomor romawi.
3. Dengan penanda *ear tag* (anting bernomor), penandaan dengan melubangi atau pengguntingan pada daun telinga atau dengan *animal identification marking system* (AIMS).

Penanda jangka pendek untuk tikus, mencit dan hamster dapat menggunakan pewarna biologis yang tidak mudah hilang seperti asam pikrat 80%-90%. Penanda jangka panjang dapat dilakukan dengan menggunakan alat khusus untuk menembus telinga atau gunting untuk memotong bentuk segitiga di tepi telinga (Ridwan, 2013).



Gambar 1. Tempat penandaan hewan uji pada beberapa bagian tubuh hewan (Badan POM).

Elektronik transponder dapat dilakukan secara permanen untuk penelitian jangka panjang, sehingga tanda tersebut tidak mudah hilang. Mencit dapat ditandai dengan melakukan pengguntingan pada daun telinga. Telinga sebelah kanan merupakan nomor satuan, sedangkan sebelah kiri merupakan nomor puluhan. Cara terakhir merupakan cara paling modern dengan menggunakan microchip (Misal JAXTag™), yang dapat digunakan untuk tagging. Microchip tersebut dilengkapi dengan software yang memudahkan untuk pendataan.



Gambar 2. Penandaan dengan larutan asam pikrat (A) dan tato pada ekor (B).



Penandaan *ear tag* (anting bernomor), tato pada ekor, melubangi daun telinga

Gambar 3. Alat penanda *ear tag* (anting bernomor) dan penandaan dengan melubangi daun telinga dan pengguntingan pada daun telinga.

2. Pengelolaan dan Pemberian Label Kandang

Kandang mencit di laboratorium dapat berupa kotak dengan ukuran panjang 40 cmx lebar 30 cmxtinggi 18 cm untuk kepadatan 5-7 ekor mencit. Rasio jantan dan betina yaitu: 1 ekor jantan dengan 4 ekor betina. Bahan kandang berupa plastik, aluminium atau baja tahan karat, serta dapat juga dari bahan kaca seperti akuarium. Prinsip umumnya adalah kandang harus mudah dibersihkan, disterilkan, tahan lama, tidak mudah dikerat oleh mencit (Nugroho, 2018).

Dasar kandang sebaiknya diberi materi yang dapat menyerap air, dan tidak mengandung senyawa berbahaya atau yang mengganggu penelitian. Alas kandang harus minimal seminggu sekali. Jika dibiarkan maka akan menimbulkan bibit penyakit. Salah satu indikator alas kandang harus diganti adalah, terciumnya bau ammoniak. Jumlah mencit dalam kandang juga mempengaruhi frekuensi pergantian alas kandang, makin banyak mencit dalam satu kandang, makin sering alas kandang harus diganti.

Bahan yang cocok digunakan sebagai alas kandang seperti sobekan kertas, serutan kayu, sisa gergajian kayu, sekam padi, atau zeolit aktif. Penempatan kandang mencit sebaiknya diletakkan di ruangan yang bersih dengan suhu lingkungan sekitar 20-25⁰C dengan kelembaban 45-55%. Menurut U.S. *Departement of Health and Human Services* (1979), syarat tempat hidup hewan uji adalah:

- a. Menyediakan ruang yang memadai, kebebasan dalam bergerak dan memiliki tempat istirahat yang sesuai untuk setiap spesies,
- b. Memberikan kenyamanan bagi hewan uji,
- c. Menyediakan jalur yang mudah untuk makanan dan minuman,
- d. Menyediakan ventilasi udara yang memadai,
- e. Sesuai dengan kebutuhan biologis hewan uji, misalnya temperatur, tempat urinasi dan defekasi, dan jika dibutuhkan, tempat untuk reproduksi,
- f. Menjaga agar hewan uji tetap kering dan bersih, sesuai dengan kebutuhan
- g. Menghindari penahanan fisik yang tidak perlu,
- h. Melindungi hewan uji dari bahaya yang diketahui.

Hewan diberi pakan yang sesuai standar laboratorium dan diberikan tanpa batas (*ad libitum*) (BPOM RI, 2014). Sebelum perlakuan hewan uji diaklimatisasi terlebih dahulu selama 5-7 hari. Seluruh hewan uji yang digunakan harus ditentukan nilai normal terhadap parameter yang akan diujikan. Pada umumnya, kelompok

hewan dan individu diidentifikasi dengan menggunakan tag pada kandang. Tag pada kandang harus meliputi beberapa informasi:

- Spesies
- Sex
- Umur
- Kelompok
- Penanggung jawab: Nomor registrasi peneliti di Lab
- Tanggal Hewan Uji masuk ke *animal house*



Gambar 4. Tag nama kandang hewan uji

C. Alat dan Bahan

Alat :

1. Sarung tangan
2. Kandang mencit (Ukuran 35x25x15)
3. Gelas Beker 10 mL
4. Kertas karton/Kertas Manila
5. Gelas Ukur

Bahan:

1. Mencit jantan
2. Sekam
3. Pakan Hewan
4. Spidol permanen
5. 10% asam pikrat
6. Spidol Permanen
7. Pelubang telinga atau gunting
8. Air

D. Cara Kerja

Memberi Kode pada Hewan uji

1. Mempersiapkan satu kandang dan dua ekor tikus.
2. Mempersiapkan larutan asam pikrat 10% dalam air dan kuas.

3. Tikus diambil satu persatu, bagian kepala, leher dan punggung diberikan tanda dengan olesan larutan asam pikrat kemudian dimasukkan kembali kedalam kandang.
4. Tikus diambil satu persatu, bagian ekor diberikan tanda penomoran romawi dengan spidol permanen kemudian dimasukkan kembali kedalam kandang.
5. Tikus diambil satu persatu, bagian daun telinga digunting bagian kiri atau kanan membentuk segitiga kemudian dimasukkan kembali kedalam kandang

Tag Kandang Hewan Uji

1. Mempersiapkan kandang dengan komponen pelengkap seperti: Sekam, botol minum, wadah makanan, penutup kandang dari kawat kasa dan Tag nama kandang.
2. Tikus dipelihara dalam kandang yang ditutup dengan anyaman kawat, kandang ditempatkan dalam ruangan dengan cahaya dan ventilasi yang cukup serta tidak terkena sinar matahari langsung.
3. Kandang percobaan dibersihkan setiap hari minimal 3 kali dalam seminggu agar tikus dapat sehat dan terhindar dari kotoran yang dapat menyebabkan infeksi.
4. Suhu dan kelembapan ruangan diperhatikan, dipertahankan suhu kamar dan kelembapan 40-60%.
5. Makan dan minum diberikan *ad libitum* (secara bebas dan terus menerus sampai tikus berhenti sendiri sesuai keinginannya).

Memberikan tag kandang (ditempel di box kandang) dengan informasi, meliputi:

Kelompok :	Jenis Kelamin :
Nomor Hewan Uji :	Tanggal Masuk AH :
Spesies :	Penanggung Jawab :

E. Hasil Pengamatan

Pelabelan Hewan uji

No	Metode Pelabelan	Kelompok Hewan Perlakuan	Foto Pelabelan
1.			
2.			
3.			

Pengelolaan dan Pemberian Label Kandang

No	Bagian dari tempat hidup hewan uji	Foto
1.		
2.		
3.		

Data suhu ruangan dan kelembapan yang diambil satu kali seminggu, disaat praktikum berlangsung, data disajikan dalam bentuk tabel.

Pertanyaan :

1. Mengapa kita perlu memberi label hewan uji?
2. Mengapa kebersihan kandang tempat hidup hewan uji harus diperhatikan?
3. Pemberian label hewan uji tergantung kepada apa saja?
4. Informasi apa saja yang harus diperhatikan dalam pemberian label kandang hewan uji?
5. Apakah ukuran dan kapasitas kandang setiap hewan uji seperti mencit dan tikus berbeda-beda?

PERCOBAAN 3

PENIMBANGAN BOBOT BADAN DAN PENGAMATAN HEWAN UJI

A. Tujuan:

1. Mahasiswa memahami dan mampu menimbang berat badan hewan uji secara mandiri.
2. Mahasiswa memahami pengamatan fisik hewan uji selama perlakuan.

B. Dasar Teori

1. Penimbangan Hewan Uji

Penimbangan berat badan hewan perlakuan dilakukan untuk memperoleh gambaran jumlah asupan dari hewan uji. Pada awal, sepanjang perlakuan (waktu yang ditentukan) dan akhir perlakuan dilakukan penimbangan berat badan, sehingga diperoleh berat badan akhir dan dapat dihitung perubahan berat badan hewan uji selama perlakuan. Perubahan berat badan secara nyata merupakan indikator yang paling mudah terlihat dan menjadi indikator adanya efek dari perlakuan yang digunakan (Lukman dan Christin, 2020).

2. Pengamatan Hewan Uji

Pengamatan perlu dilakukan selama perlakuan dan penelitian. Pengamatan yang dilakukan termasuk pada: kulit, bulu, mata, membran mukosa dan juga sistem pernafasan, sistem saraf otonom, sistem saraf pusat, aktivitas somatomotor serta tingkah laku. Selain itu, perlu juga pengamatan pada kondisi: gemetar, kejang, salivasi, diare, lemas, tidur dan koma. Hewan dalam kondisi sekarat dan hewan yang menunjukkan gejala nyeri yang berat atau tampak menderita harus dikorbankan.

C. Alat dan Bahan:

Alat:

1. Timbangan OHAUSS ketelitian sampai dengan 0,1 g
2. Sarung tangan
3. Kandang mencit dan perlengkapannya (Ukuran 35x25x15)
4. Gelas Beker 10 mL

Bahan:

1. Tikus atau mencit

D. Cara Kerja:

- 1) Penimbangan Berat Badan Hewan Uji
- 2) Mempersiapkan alat penimbangan dan Kalibrasi timbangan ke titik nol.
- 3) Satu persatu tikus atau mencit ditimbang dengan cara meletakkan mencit diatas wadah penimbangan yang berada diatas alat penimbangan hewan uji.
- 4) Perhatikan angka yang tertera dimonitor digital timbangan, sampai angka yang tertera tidak berubah, catat data angka berat badan yang diperoleh.

E. Hasil Pengamatan:

Data Pengamatan Berat Badan:

Hewan Uji	Kelompok	Berat Badan (Gram) Minggu ke- 1	Berat Badan (Gram) Minggu ke-2	Berat Badan (Gram) Minggu ke-3

Data Pengamatan hewan uji:

Hewan Uji 1	Pengamatan	Berat Badan (Gram) Minggu ke- 1	Berat Badan (Gram) Minggu ke-2	Berat Badan (Gram) Minggu ke-3
	Gerak Badan			
	Warna Bulu			
	Ada luka/Tidak			
	Mata			

Pertanyaan

1. Mengapa kita memerlukan data berat badan hewan uji?
2. Jika data berat hewan uji diminggu kedua perlakuan mengalami penurunan, apakah yang terjadi?
3. Jika tikus menalami luka dan sakit sebaiknya apa yang dilakukan?
4. Apa saja faktor yan bisa menyebabkan hewan uji berkurang dalam aktifitas fisik?
5. Apa hubungan kebersihan kandang dengan kesehatan hewan uji?

PERCOBAAN 4

TEKNIK PENGAMBILAN DARAH

A. Tujuan:

1. Mahasiswa memahami teknik-teknik pengambilan darah.
2. Mahasiswa mampu memberikan asesmen teknik pengambilan darah yang sesuai dengan desain penelitian.

B. Dasar Teori

Pengambilan darah (*blood collection*) hewan coba merupakan salah satu bagian penting dalam riset ilmiah biologi. Salah satu hal yang penting untuk diingat ketika melakukan pengambilan darah adalah menjaga tingkat stres hewan coba di level terendah. Hal ini disebabkan karena stres pada hewan coba sebelum pengambilan darah dapat mempengaruhi hasil analisis yang akan dilakukan. Pengambilan darah pada hewan coba harus dilakukan oleh orang yang berpengalaman. Hal ini juga akan menunjang izin yang akan diberikan oleh komite etik.

Hewan coba yang umumnya dipakai dalam penelitian biologi adalah tikus dan mencit. Situs pengambilan darah yang umum pada kedua jenis hewan coba ini adalah vena ekor, vena saphena (kaki), sinus orbitalis, dan jantung (intracardial). Pengambilan darah pada vena ekor biasanya dilakukan dua kali, yaitu *pre-* dan *post treatment*, sedangkan pengambilan darah dari sinus orbitalis dan intrakardial dilakukan sekali pada saat *post treatment* dan bersifat terminal (*non-survival*).

C. Alat dan Bahan:

Alat

1. Masker
2. Sarung tangan
3. Lampu pijar watt rendah / bak air
4. Spuit 3cc / gunting / cutter
5. Tabung eppendorf 1,5 ml

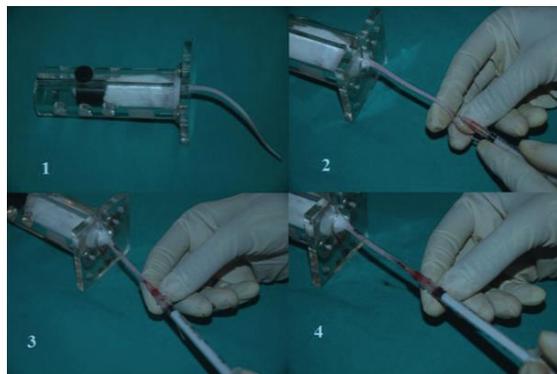
Bahan:

1. Tikus atau mencit
2. Air hangat
3. Alkohol

D. Cara Kerja:

1. Pengambilan darah dari vena ekor:

- Persiapkan bak dengan air hangat suam-suam kuku untuk merendam ekor mencit selama 5-10 detik. Alternatif langkah ini adalah dengan menghangatkan ruangan tikus dengan lampu pijar watt rendah selama 5-15 menit sebelum pengambilan darah.
- Mencit/tikus dipegang dengan cara menjepit tengkuk dan kulit di punggung dengan tangan kiri (ibu jari dan telunjuk). Bagian ekor ditarik sehingga terlihat pembuluh darah vena.
- Spuit 3cc dinjeksikan sejajar dengan vena dengan ujung jarum mengarah ke abdomen sepanjang sumbu longitudinal. Aspirasi darah dilakukan dengan lambat. Alternatif langkah ini adalah dengan membuat sayatan pada pembuluh darah vena menggunakan cutter atau memotong ekor tikus sepanjang 0,2-2 cm dari ujung ekor.
- Darah dikoleksi ke dalam 2 tabung eppendorf (dengan lapisan EDTA dan tidak dilapisi EDTA) dan siap digunakan untuk keperluan penelitian (uji gula darah, kolesterol, sediaan apusan darah dan pengamatan serum).



Gambar 1. Pengambilan darah melalui vena ekor dengan spuit

2. Pengambilan darah dari :

a. Vena

Koleksi darah dari pembuluh darah vena menghasilkan darah dalam jumlah sedikit (0,1 ml), dapat diambil melalui *superficial vein* seperti vena ekor, vena *saphenous*, vena jugular, atau vena marginal telinga.

Koleksi darah dari vena juga dapat dilakukan melalui vena cava atau vena renalis dengan pembedahan terlebih dahulu. Terminasi (eutanasi) harus segera dilakukan setelah pengambilan darah dengan metode tersebut.

b. Arteri

Koleksi darah dalam jumlah banyak dapat diperoleh dengan relatif mudah dan cepat dari arteri, misalnya arteri sentral telinga pada kelinci, tetapi harus segera dilakukan perawatan untuk mencegah perdarahan yang berlebih.

c. *Intracardiac/ Cardiac puncture*

Teknik koleksi darah dengan metode ini harus dilakukan dengan anestesi total sesuai prosedur pada masing-masing hewan coba. Terminasi harus segera dilakukan setelah pengambilan darah dengan metode tersebut.

d. Sinus orbitalis/ *Retro-orbital plexus*

Teknik koleksi darah melalui sinus orbitalis merupakan teknik yang umum digunakan karena didapatkan darah dalam jumlah besar dan dapat dilakukan berulang. Teknik ini harus dilakukan pada hewan coba yang berada di bawah anestesi total. Pembuluh darah dogores dengan mikrohematokrit (pipa kapiler) kemudian ditampung pada *microtube*.

E. Tabel Hasil Pengamatan:

Data Pengamatan Pengambilan Darah

Identitas Hewan Uji	Waktu Pengambilan Darah	Volume Darah

Pertanyaan

1. Mengapa ekor tikus harus direndam pada air hangat suam-suam kuku atau dilakukan pemanasan menggunakan lampu pijar sebelum pengambilan darah?
2. Apa fungsi EDTA pada tabung eppendorf?
3. Bagaimana cara seorang peneliti menentukan situs pengambilan darah pada mencit/tikus?

PERCOBAAN 5

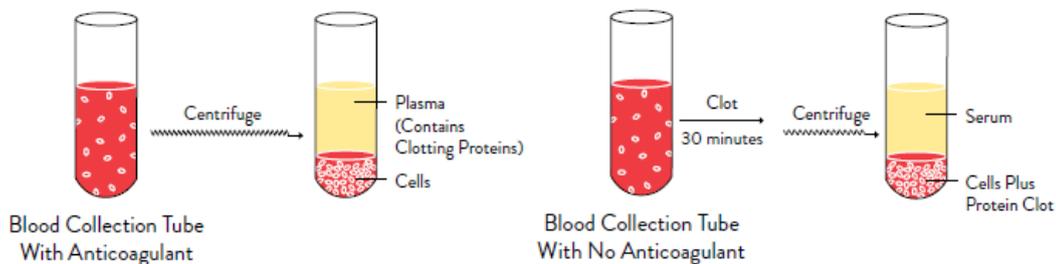
PEMISAHAN SERUM DARAH

A. Tujuan:

1. Mahasiswa memahami cara mendapatkan serum dan plasma.

B. Dasar Teori

Darah merupakan sampel biologis yang kaya akan informasi sehingga sering digunakan untuk studi biologis dan klinis. Salah satu cara menggali informasi dari sampel biologis ini adalah menggunakan matriks darah berupa serum dan plasma. Kedua matriks ini didapatkan dari *whole blood* yang telah mengalami proses biokimia yang berbeda sehingga penggunaan kedua jenis matriks ini akan berbeda sesuai dengan tujuan penelitian. Serum didapatkan dari *whole blood* yang telah mengalami koagulasi sehingga fibrinogen dan sel-sel darah akan terpisah dengan serum setelah dilakukan sentrifugasi, sedangkan plasma didapatkan dari *whole blood* yang telah diberikan perlakuan antikoagulan (EDTA, heparin).



Gambar 1. Serum dan Plasma

C. Alat dan Bahan:

Alat:

1. Sentrifuse/*spinner*
2. Rak tabung
3. Tabung eppendorf 1,5 ml
4. Mikropipet 1000 μ l

Bahan:

1. *Whole blood*

D. Cara Kerja:

1. *Whole blood* yang telah dikoleksi dari penelitian sebelumnya dikoleksi dalam 2 tabung eppendorf yang berbeda.
2. *Whole blood* dengan EDTA diputar menggunakan *spinner* selama 3 menit maka akan terbentuk 3 lapisan.
3. Lapisan jernih berupa plasma diambil menggunakan mikropipet 1000 μl . Pastikan *buffy coat* (sel darah putih) dan pellet berupa sel darah merah tidak terambil.
4. *Whole blood* yang disimpan dalam eppendorf tanpa EDTA dibiarkan selama 30 menit dalam suhu ruang sehingga terjadi koagulasi.
5. Lapisan jernih berupa serum diambil menggunakan mikropipet 1000 μl . Pastikan pellet berupa sel darah merah dan fibrinogen tidak terambil.

E. Tabel Hasil Pengamatan:

Pengamatan Karakteristik Serum dan Plasma

Sampel	Waktu Pengambilan Darah	Durasi Waktu yang Diperlukan Sampai Terbentuk <i>Clot</i>	Karakteristik (disertai gambar)	
			Serum	Plasma

Pertanyaan

1. Secara fisiologis, bagaimana karakteristik serum dan plasma?
2. *Whole blood* yang diberikan antikoagulan dan disentrifuse akan membentuk 3 lapisan. Identifikasi lapisan tersebut.
3. Mengapa darah dalam tabung yang tidak diberi antikoagulan menjadi *clot*? Bagaimana mekanismenya?

PERCOBAAN 6

PEMBUATAN HEWAN MODEL DIABETES MELITUS (DM)

A. Tujuan:

1. Mengetahui dan memahami perhitungan dosis obat
2. Mengetahui cara injeksi intraperitoneal Aloksan nonhidrat pada hewan model
3. Mengetahui bagaimana cara pembuatan hewan model DM
4. Mengetahui cara pengukuran kadar gula darah hewan uji

B. Dasar Teori

Model hewan untuk penelitian diabetes idealnya mempunyai fenotip yang dapat menggambarkan semua patogenesis diabetes mellitus (DM) yang sama dengan yang terjadi pada manusia, namun saat ini belum ada satu model tunggal yang dapat menjelaskan patofisiologi DM secara lengkap seperti yang terjadi pada manusia. Model non genetik menunjukkan kemiripan patogenesis dengan keadaan pada manusia. Model hewan diabetes non genetik adalah hewan yang dalam keadaan normal tidak mengalami DM dan perlakuan tertentu pada hewan tersebut menyebabkan hewan mengalami DM. Induksi DM dilakukan dengan cara membuang sebagian pankreas (pankreatektomi), manipulasi genetik, memberi zat kimia tertentu atau memanipulasi diet atau penggabungannya (Rees et al, 2005).

Berbagai modifikasi pada model hewan telah dilakukan untuk mendapatkan gambaran klinis dan patogenesis DM yaitu defisiensi insulin (disfungsi sel β -pankreas) dan resistensi insulin (Dorothy et al, 2012; Kaplan et al, 2006). Senyawa lain yang sering digunakan untuk induksi DM pada hewan coba adalah aloksan atau streptozotzin (STZ). Aloksan adalah turunan asam urat, dapat merusak sel pankreas secara selektif melalui mekanisme stres oksidatif. Dosis aloksan yang digunakan adalah 200 mg/kg.BB (i.p) pada tikus Spraque-Dawley jantan yang berusia 2, 4 atau 6 hari. Hasil pemeriksaan glukosa darah yang baru satu kali saja abnormal, belum cukup kuat untuk menegaskan diagnosis DM. Diperlukan pemastian lebih lanjut dengan mendapat sekali lagi angka abnormal, baik kadar glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dl, kadar glukosa darah sewaktu ≥ 200 mg/dl pada hari yang lain, atau dari hasil tes toleransi glukosa oral (TTGO) didapatkan kadar glukosa darah pasca pembebanan ≥ 200 mg/dl (Soegondo, 2009).

Tabel 1. Kadar glukosa darah sewaktu dan puasa sebagai patokan penyaring dan diagnosis DM (mg/dl) (Soegondo, 2009)

		Bukan DM	Kadar Gula darah terganggu	DM
Kadar glukosa darah sewaktu (mg/dl)	Plasma Vena	<110	110 – 199	≥ 200
	Darah Kapiler	<90	90 – 199	≥ 200
Kadar glukosa darah puasa (mg/dl)	Plasma Vena	<100	100 – 125	≥ 126
	Darah Kapiler	<90	90 - 99	≥ 100

C. Alat dan Bahan:

Alat :

1. *Glucometer* merek Accu-Check®
2. Pisau silet
3. Beker gelas
4. Batang pengaduk
5. Timbangan analitik

Bahan:

1. 2 Ekor tikus galur Wistar
2. Aquadest
3. Aloksan nonhidarat
4. NaCl 0,9% fisiologis (*saline*)
5. Jarum Suntik 1ml
6. Alkohol Swab
7. Sarung tangan
8. Lancet steril
9. Strip *glucometer*

D. Cara Kerja:

1. Persiapan dan pemeliharaan dalam perlakuan hewan model DM

- a. Timbang berat badan setiap tikus dan diamati kesehatan fisiknya (gerakannya, berat badan, makan dan minum), bila terdapat tikus yang sakit pada saat ingin melakukan perlakuan untuk hewan model DM dilaporkan ke asisten atau dosen penanggung jawab, data yang diperoleh dicatat.

b. Perhitungan Dosis Aloksan

- 1) Aloksan serbuk dilarutkan dengan NaCl 0,9% dan dibuat dalam dosis 150 mg/kg BB tikus.
- 2) Aloksan diinduksi pada tikus secara intraperitoneal dengan dosis 23-30 mg per tikus.

c. Pengukuran Glukosa Dara Tikus Wistar

- 1) Tikus dipuasakan selama 8-12 jam, tetapi tetap diberikan air minum.
- 2) Sampel darah vena dari ekor tikus diambil sebanyak 10 μ L pada minggu pertama sebelum perlakuan aloksan, kedua dan ketiga setelah dilakukan induksi aloksan untuk pengukuran kadar glukosa darah tikus menggunakan *glucometer* Accu-Check[®].

E. Tabel Hasil Pengamatan:

1. Perhitungan dosis Aloksan anhidrat 150 mg/kg BB
2. Data pengamatan Berat Badan dan kadar gula darah

Pengamatan Minggu 1:

Kelompok	n	Berat Badan (gram)	Glukosa Darah Puasa
Kontrol	1	(..... \pm)	(..... \pm)
Perlakuan	1	(..... \pm)	(..... \pm)

Pengamatan Minggu 2:

Kelompok	n	Berat Badan (gram)	Glukosa Darah Puasa
Kontrol	1	(..... \pm)	(..... \pm)
Perlakuan	1	(..... \pm)	(..... \pm)

Pengamatan Minggu 3:

Kelompok	n	Berat Badan (gram)	Glukosa Darah Puasa
Kontrol	1	(..... \pm)	(..... \pm)

Perlakuan	1	(.....±.....)	(.....±.....)
-----------	---	---------------	---------------

Pertanyaan

1. Dalam membuat hewan model kita perlu mengetahui berat badan hewan yang akan diberi perlakuan menjadi hewan model, jelaskan kenapa?
2. Apakah yang dimaksud dengan injeksi secara intraperitoneal?
3. Sebutkan perbedaan dari mekanisme kerja aloksan dan streptozin (STZ)?
4. Kapan hewan model yang diberi perlakuan aloksan dikatakan DM?
5. Mengapa kita perlu ada kelompok kontrol?

PERCOBAAN 7

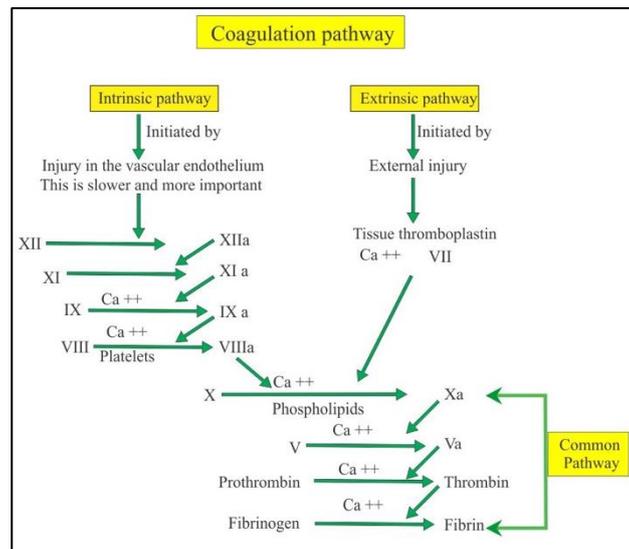
PEMBEKUAN DARAH (KOAGULASI)

A. Tujuan:

1. Mahasiswa dapat menentukan waktu beku darah.
2. Mahasiswa dapat mengidentifikasi karakteristik darah yang terkoagulasi.

B. Dasar Teori

Koagulasi merupakan sebuah rangkaian proses menuju hemostasis. Mekanisme ini berfungsi sebagai salah satu proses penyembuhan dan menghindari perdarahan karena adanya luka. Hemostasis primer adalah proses agregasi platelet untuk membentuk *plug* pada situs luka, sedangkan hemostasis sekunder meliputi jalur intrinsik dan ekstrinsik. Kedua jalur ini akan bertemu dan mengaktifkan fibrinogen menjadi fibrin (*common pathway*). Fibrin merupakan subunit-subunit yang mempunyai afinitas tinggi antara satu dengan yang lainnya sehingga dapat membentuk benang-benang fibrin yang mengikat platelet dan menstabilkan *platelet plug*.



Gambar 1. Proses Koagulasi Darah

Jalur intrinsik koagulasi darah melibatkan faktor I, II, IX, X, XI, dan XII, jalur ekstrinsik koagulasi darah melibatkan faktor I, II, VII, dan X, sedangkan *common pathway* melibatkan faktor I, II, V, VIII, dan X. Faktor-faktor ini dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok yang berfungsi sebagai katalisator proses pembekuan darah dan kelompok bukan katalisator. Kelompok faktor bukan katalisator adalah factor V, VIII, dan XIII, sedangkan kelompok faktor yang berfungsi sebagai katalisator adalah

faktor II, VII, IX, X, XI dan XII. Faktor-faktor yang berperan sebagai katalisator bersirkulasi dalam darah dalam bentuk zymogen dan akan teraktivasi menjadi protease serin. Protease serin berfungsi untuk untuk mengaktifkan zymogen menjadi protease serin lainnya (kaskade).

Darah yang telah keluar dari pembuluh darah akan mengalami perubahan karakteristik, diantaranya adalah perubahan dari sifat cair menjadi padat (fibrinogen → fibrin). Durasi waktu yang diperlukan untuk perubahan ini disebut *waktu beku darah*, yaitu waktu dari saat pengambilan darah sampai terjadinya koagulasi.

C. Alat dan Bahan:

Alat

1. Masker
2. Sarung tangan
3. Gelas arloji berlapis paraffin
4. Bak air
5. Jarum pentul
6. *Blood lancet*
7. *Stopwatch*
8. Tisu/kapas

Bahan:

1. Tikus atau mencit
2. Air hangat
3. Alkohol

D. Cara Kerja:

1. Persiapkan bak dengan air hangat suam-suam kuku untuk merendam ekor mencit selama 5-10 detik.
2. Mencit/tikus dipegang dengan cara menjepit tengkuk dan kulit di punggung dengan tangan kiri (ibu jari dan telunjuk). Bagian ekor ditarik sehingga terlihat pembuluh darah vena. Letakkan gelas arloji di bawah ekor untuk emnampung darah.
3. Situs untuk penusukan *lancet* dibersihkan menggunakan alkohol lalu *lancet* ditusukkan. Catat waktu ketika darah pertama kali keluar.

4. Jarum pentul digunakan pada darah yang telah berada dalam gelas arloji. Tusukkan jarum pentul dalam darah kemudian tarik perlahan ke atas secara berulang sampai terlihat benang fibrin kemudian catat waktunya. Lakukan ulangan dalam interval waktu 30 detik.

E. Tabel Hasil Pengamatan:

Data Pengamatan Koagulasi Darah

Identitas Hewan Uji	Waktu Pengambilan Darah	Waktu Mulai Muncul Benang Fibrin	Waktu Beku Darah

Pertanyaan

1. Apa artinya jika terdapat waktu beku darah tinggi?

PERCOBAAN 8

PERHITUNGAN KADAR HEMOGLOBIN

A. Tujuan:

1. Mahasiswa dapat menentukan kadar hemoglobin.
2. Mahasiswa dapat mengidentifikasi karakteristik darah berdasarkan kadar hemoglobin.

B. Dasar Teori

Hemoglobin merupakan sebuah protein yang mengandung ion besi (Fe^{2+}) pada sel darah merah hewan dan manusia. Fungsi hemoglobin adalah sebagai alat transport oksigen ke jaringan. Hemoglobin juga merupakan substansi yang memberikan warna merah pada darah yang terdiri dari 4 rantai polipeptida; setiap rantai mengandung ion besi (Fe^{2+}). Hemoglobin membentuk ikatan yang tidak stabil dengan oksigen. Pada saat hemoglobin mengikat oksigen (*oxygenated*) maka warna darah akan menjadi merah terang. Namun, pada saat hemoglobin tidak mengikat oksigen (*deoxygenated*), maka warna darah akan menjadi keunguan. Eritrosit yang mengandung hemoglobin diproduksi di sumsum tulang belakang. Proses produksi eritrosit (*erythropoiesis*) diatur oleh sebuah hormon glikoprotein yang disebut *erythropoietin* yang diproduksi oleh ginjal karena ada stimulasi hipoksia.

Kadar hemoglobin dapat ditentukan dengan beberapa cara, di antaranya adalah metode Sahli, dan menggunakan alat tes cepat (*rapid test*). Metode Sahli menggunakan pengamatan secara visual komparasi warna sehingga tingkat subyektifitas cukup tinggi. Oleh karena itu, pada praktikum ini akan digunakan alat tes cepat (*EasyTouch GCHb*).

C. Alat dan Bahan:

Alat

1. Masker
2. Sarung tangan
3. Bak air
4. Gelas arloji
5. *Blood lancet*
6. Tisu/kapas
7. Alat Tes *GCHb (EasyTouch)*
8. Kamera

Bahan:

1. Tikus atau mencit
2. Air hangat
3. Alkohol
4. Strip Hb *EasyTouch GCHb*

D. Cara Kerja:**1. Rapid test**

- 1) Alat rapid test disiapkan dengan mengganti kode dan memasukkan strip Hb.
- 2) Persiapkan bak dengan air hangat suam-suam kuku untuk merendam ekor mencit selama 5-10 detik.
- 3) Mencit/tikus dipegang dengan cara menjepit tengkuk dan kulit di punggung dengan tangan kiri (ibu jari dan telunjuk). Bagian ekor ditarik sehingga terlihat pembuluh darah vena.
- 4) Situs untuk penusukan *lancet* dibersihkan menggunakan alkohol lalu *lancet* ditusukkan. Darah ditampung dalam gelas arloji kemudian diamati dan didokumentasi.
- 5) Darah yang keluar dimasukkan dalam strip Hb dan ditunggu sampai nilai Hb tampil di layar.
- 6) Catat Hb tiap sampel dalam tabel pengamatan.

Metode Sahli**Alat dan Bahan**

1. Hemometer
2. Aquadest
3. 0,1 N HCl
4. Darah kapiler

Cara Kerja :

1. Tabung pengencer / pengukur hemometer diisi dengan 0,1 N HCl sampai angka 2
2. Isaplah darah kapiler dengan pipet Hb sampai angka 20.
3. Hapuslah darah yang melekat pada ujung pipet
4. Sebelum darah menjendal, segera dimasukkan dalam tabung pengencer tersebut dengan cara ujung pipet masuk sedikit ke dalam larutan 0,1 N HCl.

5. Isaplah Hcl di dalam tabung ke dalam pipet, kemudian dikeluarkan lagi.
6. Diamkan selama 1-2 menit.
7. Encerkan dengan aquadest setetes demi setetes dan diaduk dengan batang pengaduk, sampai warnanya sesuai dengan warna standar.
8. Kadar Hb adalah angka pada tabung pengencer hemometer yang terletak sesuai dengan permukaan larutan darah tersebut.

E. Tabel Hasil Pengamatan:

Data Hasil Pengukuran Hemoglobin

Identitas Hewan Uji	Waktu Pengambilan Darah	Kadar Hemoglobin	Karakteristik Darah (warna, kekentalan)

PERCOBAAN 9
TEKNIK APUSAN DARAH (HEMOGRAM)

A. Tujuan

1. Mengetahui cara menghitung leukosit dengan menggunakan apusan darah.

B. Dasar Teori

Prinsip kerja dari hemogram adalah setetes darah dibuat apusan pada gelas benda. Apusan darah merupakan salah satu cara mengamati materi-materi yang ada dalam darah seperti sel darah merah, sel darah putih dan keping darah.

Pewarnaan giemsa adalah teknik pewarnaan untuk pemeriksaan mikroskopis yang namanya diambil dari seorang peneliti malaria yaitu Gustay Giemsa. Sebetulnya ada beberapa metode pewarna yaitu a.l. : pewarnaan, methanol giemsa atau acetone giemsa, kriwit de jonge dan variasi dari methanol giemsa. Pewarnaan giemsa digunakan untuk membedakan inti sel dengan morfologi sitoplasma dari sel darah merah, sel darah putih, trombosit dan parasite yang ada di dalam darah.

C. Alat dan Bahan :

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| 1. Kapas dan alcohol | 5. Pemulas giemsa |
| 2. Jarum francke | 6. Larutan buffer |
| 3. Gelas benda | 7. Methanol / acetone |
| 4. Kertas saring | 8. Mikroskop |
| | 9. Gloves |

D. Cara Kerja :

1. Membuat sediaan apus

- a. Bersihkan jari dengan kapas yang telah dibasahi alkohol 70%
- b. Sesudah kering, tusuklah ujung jari tersebut dengan jarum francke, sedalam kurang lebih 3-4 mm
- c. Darah yang keluar ditetaskan pada ujung kanan gelas benda I yang bersih.
- d. Ambillah gelas benda II yang bersih. Sentuhkan salah satu sisi ujungnya pada gelas benda I di sebelah kiri tetesan darah tadi, sedemikian rupa sehingga kedua gelas benda itu membentuk sudut 45° ke kanan

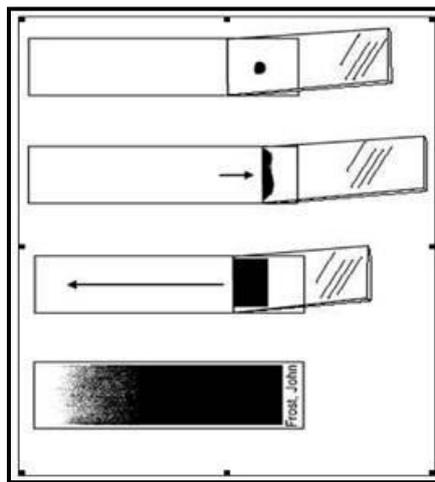
- e. Gerakkanlah gelas benda II ke kanan, sehingga tetesan darah berada di sudut antara gelas benda I dan gelas benda II dan merupakan garis yang tipis.
- f. Gelas benda II digerakkan ke kiri dengan cepat dan teratur, tanpa mengubah besar sudutnya. Dengan demikian terjadilah sediaan apus dari darah, berupa lapisan yang tipis dan homogen pada gelas benda I
- g. Biarkanlah sediaan ini kering
- h. Sesudah kering, kemudian dipulas atau diwarnai dengan pemulas methanol giemsa.

2. Cara pengecatannya

- a. Sediaan apus yang telah kering tadi diletakkan di atas rak pengecatan atau di atas 2 gelas benda.
- b. Sediakan apus difiksasi dengan methanol selama 3-5 menit, kemudian dibuang.
- c. Tetesilah dengan larutan giemsa (9-10 tetes dalam 10 ml air buffer) dan dibiarkan selama 20-30 menit, lalu dibuang.
- d. Cuci dalam air mengalir, lalu dikeringkan/ dibiarkan di udara kamar.

3. Pengamatan

- e. Hitunglah 100 butir leukosit yang ditemukan, masukkan dalam tabel hasil pengamatan, sampai mencapai 10 buah untuk tiap kolom ke bawah, sehingga dengan demikian kita harus mengisi 10 X kolom ke bawah untuk memperoleh 100 butir leukosit.
- f. Kemudian ambil prosentase dari masing-masing leukosit.



Gambar Teknik Apusan Darah

PERCOBAAN 10

MENGHITUNG JUMLAH ERITROSIT DAN JUMLAH LEUKOSIT

A. Tujuan

1. Mengetahui cara menghitung jumlah eritrosit dan leukosit dengan menggunakan alat yang berupa Hemositometer *double improved neubauer*.

B. Dasar Teori

Setiap mikroliter darah manusia mengandung 5-6 juta sel darah merah, dan ada sekitar 25 triliun sel-sel jenis ini dalam 5 L darah dalam tubuh. Fungsi utamanya adalah transpor O₂. Meskipun ukurannya kecil, satu eritrosit mengandung sekitar 250 juta molekul hemoglobin. Secara normal dalam 1 μL darah manusia mengandung sekitar 5.000-10.000 leukosit, dan jumlah tersebut dapat meningkat secara temporer setiap kali tubuh memerangi infeksi. Fungsi leukosit adalah untuk memerangi infeksi di dalam tubuh, dan sebagian besar diantaranya bersifat fagositik yaitu menelan dan mencerna mikroorganisme maupun sisa sel tubuh yang sudah mati.

C. Alat dan Bahan Yang Diperlukan.

1. Pipet pencampur 1-101 untuk eritrosit
2. Pipet pencampur 1-11 untuk Leukosit
3. Bilik hitung dari Hemositometer *double improved neubauer*.
4. Mikroskop
5. Darah kapiler
6. Larutan hayem
7. Larutan turk
8. Gloves
9. Kertas saring/tissue

Bilik hitung

Bilik hitung hemositometer *type double improved neubauer* berbentuk bujur sangkar dengan sisi-sisinya 3 mm. bilik ini dibagi menjadi 9 bujur sangkar yang tengah-tengahnya dibagi lagi masing-masing 1 mm. Bujur sangkar yang di tengah-tengah dibagi lagi menjadi 25 bujur sangkar dengan sisi 1/5 mm, sedangkan yang dipojok-pojok dibagi

lagi 16 bujur sangkar dengan sisi $\frac{1}{4}$. 25 bujur sangkar yang tengah ini masing-masing dibagi lagi menjadi 16 bujur sangkar dengan sisi $\frac{1}{20}$ mm.

Leukosit dihitung di dalam bujur sangkar dengan sisi $\frac{1}{4}$ mm, sedangkan eritrosit dihitung didalam bujur sangkar dengan sisi $\frac{1}{20}$ mm

Jarak antara bilik hitung dengan gelas penutup = $\frac{1}{10}$ mm, sehingga:

- Volume bujur sangkar dengan sisi $\frac{1}{4}$ mm = $\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{10} \text{ mm}^3$.
- Volume bujur sangkar dengan sisi $\frac{1}{20}$ mm = $\frac{1}{20} \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{10} \text{ mm}^3 = \frac{1}{4000} \text{ mm}^3$

D. Cara Kerja

1. Menghitung Jumlah Leukosit :

Di dalam pengenceran 10 X

- a. Darah yang keluar dari ujung jari probandus diisap sampai angka 1,0 pada mikropipet, kemudian ujungnya dibersihkan dengan kertas saring.
- b. Isaplah larutan turk yang telah ditentukan terlebih dahulu dalam tabung, sampai angka 11.
- c. Ambillah pipa karet (yang dipakai untuk menghisap) dari pipet. Kemudian pipet dipasang pada ujungnya dengan ibu jari dan jari telunjuk dan gojokkan selama 2 menit
- d. Buanglah beberapa tetes (1-2 tetes), baru tetes-tetes berikutnya dipakai untuk menghitung. (mengapa harus dibuang?).
- e. Ujung pipet ditempelkan pada tepi gelas penutup, sehingga cairan dalam pipet dapat masuk dengan sendirinya ke dalam bilik hitung dengan daya kapilaritasnya.
- f. Lihatlah di bawah mikroskop mula-mula dengan pembesaran lemah kemudian dengan pembesaran kuat !
- g. Hitunglah semua Leukosit yang terdapat di dalam bujur-bujur sangkar pojok. Jadi jumlah bujur sangkar yang dihitung menjadi $4 \times 16 = 64$ bujur sangkar dengan sisi masing-masing $\frac{1}{4}$ mm.

Perhitungan sebagai berikut :

Jumlah bujur sangkar yang dihitung = 64 dan volume masing-masing = $\frac{1}{160} \text{ mm}^3$

- darah diencerkan 10 X
- jumlah Leukosit terhitung = L

$$\text{jumlah Leukosit per } \text{mm}^3 = \frac{L}{64} \times 160 \times 10 = 25L .$$

2. Menghitung jumlah eritrosit :

Untuk menghitung eritrosit adalah sebagai berikut:

- Pengenceran darah 100 X
- Cairan pengencernya ialah larutan Hayem.
- Semua eritrosit yang dihitung, yang terdapat di dalam bujur-bujur sangkar kecil dengan sisi 1/20 mm, atau dengan volume masing-masing 1/4000 mm^3

di sini dipergunakan 80 bujur sangkar kecil.

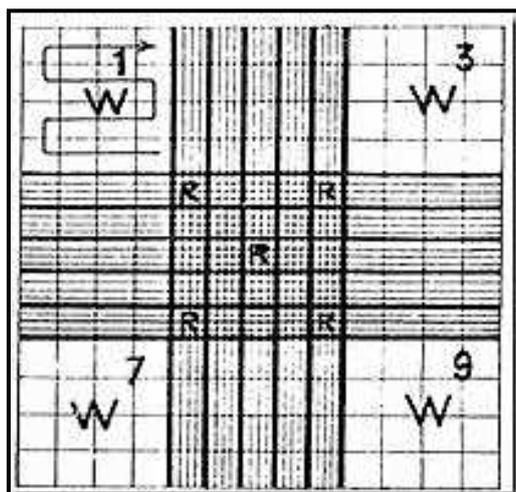
Jadi perhitungan sebagai berikut :

- volume bujur sangkar kecil = 1/4000 mm^3
- pengenceran darah 100X
- jumlah eritrosit terhitung = E
- jumlah bujur sangkar = 80

$$\text{jumlah eritrosit} = \frac{E}{80} \times 4000 \times 100 = 5000E$$

Catatan

- Leukosit / eritrosit yang terletak pada garis batas sebelah kiri dan atas dari satu bujur sangkar masih ikut dihitung, sedangkan yang terletak pada garis kanan dan bawah tidak.
- usahakan untuk menghitung sel darah dengan memakai alat perhitungan darah (blood counter).



Gambar Bilik Hitung pada Hemositometer

Keterangan :

W (*White blood cell*)= Bilik hitung Leukosit (P=1/4mm; l=1/4 mm; t= 1/10 mm)

R(*Red Blood cell*)= Bilik Hitung Eritrosit (P=1/20 mm; l= 1/20 mm; t=1/10 mm)

PERCOBAAN 11

UJI HEMATOLOGI LENGKAP

A. Kemampuan Dasar:

1. Mahasiswa dapat membaca hasil tes hematologi lengkap.
2. Mahasiswa dapat mempelajari prinsip kerja *hematoanalyzer*.

B. Tujuan:

1. Mahasiswa dapat menginterpretasikan hasil tes hematologi lengkap.

C. Dasar Teori

Peran darah dalam penelitian klinis/biomedik sangat penting karena salah satu fungsi darah adalah untuk transport substansi baik dari perlakuan/*treatment* yang masuk dalam tubuh maupun metabolit yang dihasilkan oleh tubuh. Oleh sebab itu, darah sering kali menjadi salah satu parameter pokok untuk dianalisis. Uji hematologic juga kerap disebut dengan *complete blood count* (CBC). Hasil pengujian hematologi darah disebut dengan *hematology report* yang berisi profil eritrosit (jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, dan persentase hematokrit), profil leukosit (jumlah total leukosit, jumlah neutrofil, jumlah limfosit, dan *mixed* (gabungan jumlah monosit, eosinophil, dan basofil), dan profil trombosit (jumlah trombosit). Hasil perhitungan profil darah umumnya digunakan untuk menarik kesimpulan Kesehatan umum dan mendeteksi dini adanya penyakit/kondisi tertentu seperti infeksi, anemia, leukemia, dan lain sebagainya.

D. Cara Kerja :

1. Kedua *hematology report* yang terlampir dalam modul praktikum ini dan dicermati. Deskripsikan hasil pencermatan dalam laporan dan tentukan *hematology report* yang menunjukkan abnormalitas.



RUMAH SAKIT HEWAN PROF. SOEPARWI
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Gadjah Mada

Jl. Fauna No 1 Karangmalang, Yogyakarta 55281
 Telp : 0274-564707/564708 Fax : 0274-564708
 email : rsh_Prof.Soeparwi@yahoo.co.id

FORM HASIL PEMERIKSAAN LABORATORIUM
RUMAH SAKIT HEWAN PROF. SOEPARWI

No ID/Reg : 13/09/K/08/2021 Pengirim :
 Nama Hewan : Kucing BRUNO Dokter Hewan : drh. Sri Widowati Anjarsari
 Jenis Hewan/Ras : Kucing domestik Alamat : Panda Pets & Care
 Jenis Kelamin : Jantan Tanggal : 9 Agustus 2021
 Umur : 2 Tahun

PEMERIKSAAN	HASIL		NILAI RUJUKAN KUCING **	SATUAN	METODE	
HEMATOLOGI						
Hemoglobin	9,0	L	9.5-15.0	gr/dL	vet hematology analyzer	
Hematokrit	27,0	L	29.0-45.0	%	vet hematology analyzer	
Eritrosit	5,24	L	6.0-10.0	10 ⁶ /μL	vet hematology analyzer	
Leukosit	64,6	H	5,5 - 19,5	10 ³ /μL	vet hematology analyzer	
Trombosit	241		150-600	10 ³ /μL	vet hematology analyzer	
TPP	9,0	H	6,0 - 7,5	gr/dL	Refraktometer	
INDEX						
MCV	51,5		41-54	fL	vet hematology analyzer	
MCH	17,2		13.5-17.5	pg	vet hematology analyzer	
MCHC	33,3		31-36	%	vet hematology analyzer	
RDW	16,4		-	%	vet hematology analyzer	
INDEX TROMBOSIT						
MPV	12,4		-	fL	vet hematology analyzer	
PDW	15,3		-		vet hematology analyzer	
PCT	0,298		-	%	vet hematology analyzer	
HITUNG JENIS						
Neutrofil	R	85,7	H	35.0-75.0	%	vet hematology analyzer
	A	55,4	H	2,5 - 12,5	10 ³ /μL	
Basofil	R	0,0		0 - 1,0	%	vet hematology analyzer
	A	0,0		0.0-0.1	10 ³ /μL	
Eosinofil	R	4,7		2.0-12.0	%	vet hematology analyzer
	A	3,0	H	0.0-1.5	10 ³ /μL	
Limfosit	R	5,9	L	20.0-55.0	%	vet hematology analyzer
	A	3,8		1.5-7.0	10 ³ /μL	
Monosit	R	3,7		1.0-4.0	%	vet hematology analyzer
	A	2,4	H	0.0-0.85	10 ³ /μL	

** Larry Patrick Tilley, Francis W.K. Smith, Jr. (2016).
 Blackwell's five-minute veterinary consult : canine and
 feline 6th Edition . Ames, Iowa :Blackwell

Keterangan: Report diambil berdasarkan *consent* dari drh. Sri Widowati Anjarsari



PDHB drh. Bagus Brahmento Aji Guno M.SC dan TIM
 Gg. Menur No.15, Santren, Caturtunggal, Kec. Depok, Kab. Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281
 Telp : 0856-4047-3600 | email : djiopetscare@gmail.com | IG : @djiopetscare

**HASIL PEMERIKSAAN HEMATOLOGI RUTIN
PASIEN KUCING**



Nama Hewan : UCIL
 Sinyalemen : *cat, male, 1 y.o*
 Dokter Pemeriksa : -
 Penanggung jawab lab : drh. Bagus Brahmento Aji M.Sc.

Item	Hasil	unit	alarm	Nilai Rujukan
Leukosit	8.3	10 ³ / uL	Normal	5.5-19.5
<i>Limfosit</i>	2.2	10 ³ / uL	Normal	0.8-7
	27.0	%	Normal	12.0-45.0
<i>Mid</i>	0.1	10 ³ / uL	Normal	0.0-1.9
	1.7	%	Normal	2.0-9.0
<i>Granulosit</i>	6.0	10 ³ / uL	Normal	2.1-15
	71.3	%	Normal	35-85
<i>Eosinofil</i>	0.138	10 ³ / uL	Normal	0-1.5
Eritrosit	10.25	10 ⁶ / uL	High	4.6-10
Hemoglobin	16.9	g/dL	High	9.3-15.3
HCT	47.4	%	Normal	28.0-49.0
MCV	46.3	fL	Normal	39.0-52.0
MCH	16.5	pg	Normal	13.0-21.0
MCHC	35.6	g/dL	Normal	30.0-38.0
Trombosit (PLT)	527	10 ³ / uL	High	100-514
MPV	12.3	fL	High	5.0-11.8
PCT	0.648	%	High	0.1-0.5

Hasil:
Sel darah putih. Terbaca normal.

Sel darah merah. Tampak adanya peningkatan total sel darah merah (eritrosit) dan hemoglobin yang menandai kondisi Polisitemia. Kondisi polisitemia dapat berlangsung relatif jika terjadi akibat dehidrasi, disarankan untuk memastikan ada tidaknya gejala klinis dehidrasi yang menyertai. Konfirmasi ke arah polisitemia absolut diperlukan pemeriksaan hematologi kembali dengan mesin yang berbeda.

Trombosit. Peningkatan total trombosit dengan peningkatan PCT dan MPV menandai adanya clumping trombosit jika melihat dari kurva landai yang terbentuk dari pemeriksaan platelet oleh mesin.



Keterangan: *Report* diambil berdasarkan *consent* dari drh. Sri Widowati Anjarsari

ACARA 12

ANALISIS SPERMA

A. Tujuan

1. Mengetahui prinsip dan cara menganalisis kualitas sperma
2. Mengetahui cara pengamatan motilitas sperma
3. Mengetahui cara perhitungan jumlah sperma

B. Dasar Teori

Struktur suatu sel sperma disesuaikan dengan fungsinya. Pada manusia, kepala yang mengandung nukleus haploid memiliki vesikel dan akrosom di bagian ujung mengandung enzim-enzim yang membantu sperma menembus sel telur (Campbell, 2008). Menurut Nallela et al. (Yunianto, 2010) bahwa jumlah dan motilitas sperma merupakan parameter yang tepat dan penting dalam mengetahui tingkat kesuburan disamping aspek morfologi sperma. Menurut Nurliani (2010), motilitas sperma sangat erat hubungannya dengan dengan fertilisasi. Jika sperma berenang atau bergerak sangat lambat maka jumlah total sperma yang membuahi ovum terlalu sedikit. Untuk mendekati ovum, sperma harus berenang dengan cepat dan bergerak seperti spiral yang disebut dengan pola kapasitas motilitas (*capacitating motility pattern*).

C. Bahan dan Alat :

1. Mencit Jantan
2. Mikroskop
3. Mikropipet 10 μ L
4. *Hand counter*
5. Hemositometer *Double Improved Neubaur*
6. Gelas Penutup
7. Inkubator
8. Cawan petri kecil
9. Perangkat alat bedah
10. Kloroform
11. Larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS)
12. Pipet Ukur 1ml + Propipet

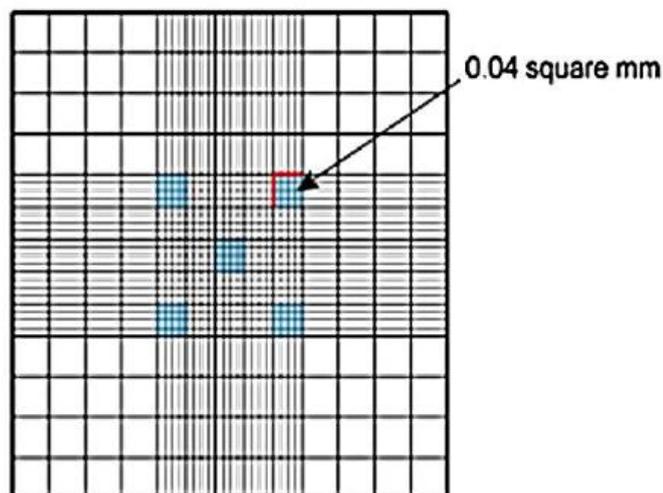
D. Cara Kerja :

1. Pembuatan Suspensi Sperma

- Mencit dibius dengan kloroform dan kemudian dibedah untuk diambil epididimis menggunakan gunting bedah.
- Sebelum proses pembedahan, disiapkan larutan *Phospate Buffer Saline* (PBS) di dalam inkubator pada suhu 37°C.
- Setelah organ testis dikeluarkan, kemudian bagian kauda epididimisnya dipisahkan dari testis tersebut.
- Kauda epididimis diletakan pada cawan petri berisi larutan PBS 1ml dengan suhu 37°C, Kemudian dipotong berulang kali menggunakan gunting bedah.
- Suspensi ini digunakan untuk mengamati motilitas dan jumlah sperma (Parhizkar, 2013).

2. Pengamatan Motilitas Sperma

- Setelah pembuatan suspensi sperma selesai, diletakan cover slip pada Hemositometer *Improved Neubeur* sebelum pengamatan. Diambil 10 µL suspensi sperma dari 1 ml PBS dengan menggunakan mikropipet 10 µL.



Gambar Bagian Hemositometer untuk Menghitung Motilitas dan Jumlah Sperma Mencit

- Kemudian suspensi sperma dimasukan dalam kamar Hemositometer *Improved Neubeur*, diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x dan dihitung pada bagian kotak 4x4 ukuran 0.04 mm (Wiryawan, 2009; Parhizkar, 2013).
- Kemudian dihitung motilitas sperma mencit dengan menggunakan kategori motilitas sperma dari Parhazikar (2013), yaitu meliputi :
 - Sperma immotil dan tidak dapat bergerak.

- II. Motilitas sperma tidak progresif. Sperma tidak dapat berpindah dari tempatnya dan hanya bisa menggerakkan ekornya (*vibrating-like movement*).
 - III. Pergerakan sperma tidak linear (*non-linear motility*). Sperma bergerak lambat dan hanya bergerak memutar atau tidak lurus.
 - IV. Motilitas sperma progresif, sperma berenang sangat kuat dan cepat serta pergerakannya lurus.
- d. Perhitungan menggunakan alat *Hand Counter*. Setelah dihitung motilitas mencit, kemudian hasil perhitungan dimasukkan ke dalam rumus sebagai berikut :

$$\text{Presentasi kriteria motilitas} = \frac{\text{jumlah sperma pada Kriteria A}}{\text{total jumlah sperma seluruh kriteria}} \times 100\%$$

(Parhizkar, 2013).

3. Perhitungan Jumlah Sperma

- a. Setelah pengamatan motilitas sperma selesai, kemudian ditunggu selama 10-15 menit sampai seluruh sperma pada bilik hitung tidak bergerak.
- b. Kemudian dihitung jumlah sperma pada kotak kecil ukuran 0.04 mm pada bagian yang ditunjuk pada Gambar 5 (Parhizkar, 2013).
- c. Setelah dihitung kemudian bilik hitung digeser untuk diamati pada kamar bilik di bagian sisi lainnya. Perhitungan dua kali tersebut dianggap sebagai hasil ulangan. Kemudian diambil rata-rata dan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

Jumlah sperma = total jumlah sperma pada 5 kotak x 50.000 x100 (sel/ml) (Parhizkar, 2013).

PERCOBAAN 13

UJI TOKSISITAS BSLT

A. Tujuan

1. Mengetahui perhitungan dosis perlakuan uji Toksisitas BSLT
2. Memahami prinsip uji toksisitas BSLT dan mampu menganalisis nilai LC₅₀ kematian larva udang (*Artemia salina* Leach.) selama 24 jam yang diberi ekstrak air tumbuhan.

B. Dasar Teori

Toksisitas akut adalah efek berbahaya yang terjadi segera setelah terpapar suatu zat tunggal atau kombinasi zat (*substance*) sekali atau beberapa kali Uji toksisitas akut adalah tata cara tertentu yang dirancang untuk menentukan dosis letal median (LD₅₀ & LC₅₀) suatu zat dan kemungkinan mekanisme kerja dan target organnya. Uji toksisitas bertujuan untuk menentukan potensi suatu senyawa sebagai racun dengan mengetahui tingkat toksisitas dari suatu ekstrak. Sitotoksik merupakan senyawa yang bisa digunakan untuk anti kanker yang memiliki kemampuan menghambat dan menghentikan pertumbuhan sel kanker (Puspitasari *et al.*, 2018). Agen sitotoksik bisa ditemukan melalui metode uji awal salah satunya *Brine Shrimp Lethality* (BSLT) menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach dilihat dari hasil LC₅₀. Nilai dari LC₅₀ akan menunjukkan nilai konsentrasi hambatan sebesar 50% dari populasi. Nilai tersebut menunjukkan konsentrasi senyawa berpotensi sebagai sitotoksik.

Metode BSLT telah teruji hasilnya dengan tingkat akurat 95% dalam mengamati toksisitas suatu senyawa dan memiliki korelasi dengan sitotoksik senyawa anti kanker (Gadir, 2012). Larva udang *Artemia salina* Leach digunakan sebagai indikator dengan cara melihat jumlah larva udang yang mati, semakin tinggi jumlah kematian larva maka semakin tinggi sifat toksik dari suatu ekstrak. Setelah pengamatan aktivitas senyawa aktif ekstrak tumbuhan selama 24 jam lalu menghitung nilai LC₅₀.

C. Alat dan Bahan :

Alat:

- | | | |
|-----------------------|------------------|-------------|
| 1. Timbangan analitik | 8. Kaca Pembesar | 9. Akuarium |
| 2. Corong kaca | 10. Aerator | |
| 3. Gelas ukur 1 L | 11. Lampu | |

4. Pipet ukur
5. Pipet tetes
6. Labu ukur
12. Spatula
13. Botol jam

Bahan:

1. Simplisia air tanaman
2. Larva udang (*Artemia salina* Leach.) (Telur)
3. Air laut
4. Aquadest
5. Suspensi ragi (Fermipan)^R
6. Plastik
7. Kertas saring

D. Cara Kerja :

1. Ekstrak tanaman

- a. Simplisia tanaman diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut air, kemudian disaring dan diambil filtratnya.
- b. Hasil maserasi dipisahkan menggunakan corong pisah dan kertas saring.
- c. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *water bath* hingga diperoleh ekstrak kental.

2. Uji Toksisitas BSLT

- a. Persiapan Hewan Uji
 - 1) Mempersiapkan telur (kista) larva udang *Artemia salina* ditimbang sebanyak 5 gram lalu direndam dalam aquadest selama 1 jam
 - 2) Telur yang tenggelam dipindahkan dalam wadah (akuarium) yang telah terbagi menjadi dua ruang yang dihubungkan oleh lubang kecil. Ruang penetasan diberi kondisi gelap sedangkan yang lain diberi penerangan cahaya lampu dan diberi aerator yang berfungsi sebagai penyuplai oksigen dan menjaga agar telur tidak mengendap.
 - 3) Larva udang siap untuk digunakan dalam pengujian setelah berumur 48 jam.
- b. Pembagian Konsentrasi Ekstrak
- c. Ekstrak ditimbang menggunakan timbangan analitik sebanyak 1gram dilarutkan dalam 1000 ml aquadest sebagai larutan induk 1000 ppm, lalu dilanjutkan pengenceran bertingkat untuk membuat konsentrasi perlakuan 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 50 ppm, 0 ppm dengan melakukan pengulangan tiga kali

Rumus pengenceran:

$$V1 M1 = V2 M2$$

Keterangan:

V1 = Volume awal

M1 = Konsentrasi awal

V2 = Volume akhir

M2 = Konsentrasi akhir

d. Perlakuan Uji Toksisitas

- 1) *Artemia salina* Leach. umur 48 jam yang sehat (bergerak aktif) dipilih secara acak sebanyak 10 ekor kedalam 50 ml larutan masing masing konsentrasi dan pengulangan, kemudian ditambahkan 1 tetes suspensi ragi sebagai makanan *Artemia salina* Leach.
- 2) Botol jam diletakkan di bawah lampu penerangan selama 24 jam, setelah 24 jam jumlah larva yang hidup dihitung dengan bantuan kaca pembesar.
- 3) Larva yang tidak bergerak selama observasi maka dikategorikan sebagai larva yang mati.

e. Analisis dan Pengolahan Data

- 1) Teknik analisa yang digunakan untuk uji mortalitas larva udang dengan menggunakan metode probit. Hasil kematian larva (*lethal concentration* 50% LC₅₀) udang dimasukkan ke dalam tabel probit. Kemudian nilai konsentrasi dikonversi menjadi log (=Log 10+nilai konsentrasi). Nilai probit dihitung melalui persentase kematian dan nilai logaritma dari konsentrasi yang digunakan. Persen kematian larva dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kematian larva (\% Mortalitas)} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva total awal}} \times 100\%$$

- 2) Berdasarkan nilai % mortalitas yang dimasukkan dalam tabel hasil ditentukan nilai probit dari tabel Finney's of Probit:

Tabel 1. Tabel persentase probit

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.25	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

f. Analisis regresi dari data yang didapat dengan persamaan $y = ax + b$ menggunakan *Microsoft Excel*. X adalah variabel independen yaitu nilai Log ppm dan Y adalah variabel respon atau data probit (**lampiran 1**).

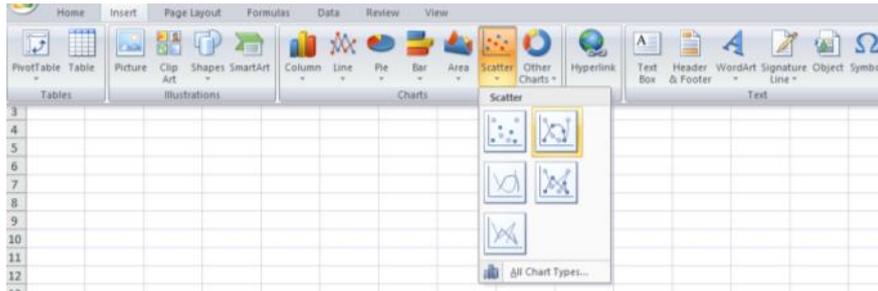
1) Melalui analisis regresi didapatkan nilai intercept dan log konsentrasi. Setelah memperoleh persamaan maka Y diganti dengan angka 5 sebagai probit dari 50% kematian hewan uji yang nantinya akan menghasilkan X sebagai log konsentrasi. Anti log X merupakan nilai LC_{50} . Nilai tersebut dimasukkan dalam perhitungan mencari LC_{50} ekstrak tumbuhan pada persamaan berikut:

	<i>Coefficients</i>
Intercept	b
Log Konsentrasi	a

Persamaannya: $y = ax + b$

$$LC_{50} = \text{Antilog}(a)$$

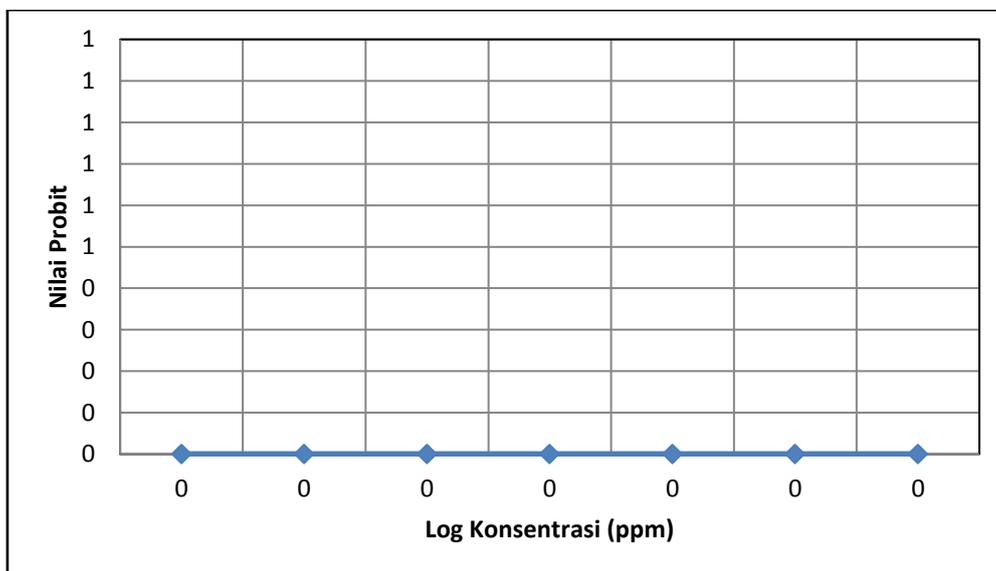
- Analisis menggunakan *Microsoft Excel* dengan membuat persamaan garis lurus yang menghubungkan antara nilai log konsentrasi dengan nilai probit persentase kematian. Dengan memblok kolom y dan x kemudian klik insert → *scatter* → pilih *scatter with smooth lines and markers* → sesuaikan bentuk diagram.



E. Tabel Hasil Pengamatan:

Tabel 1. Jumlah larva udang *Artemia salina* Leach. Yang mati/10 larva karena pengaruh ekstrak air tumbuhan setelah waktu 24 jam dan nilai LC₅₀ pada uji BSLT

Konsentrasi (%)	Log Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva <i>Artemia salina</i> yang mati tiap botol jam			Rerata + SD Larva mati	% Mortalitas	Probit	LC ₅₀ (ppm)
		P1	P2	P3				
500								
250								
125								
0								



Pertanyaan:

1. Metode BSLT adalah?
2. Perbedaan toksisitas dengan sitotoksik adalah?
3. Apa yang dimaksud dengan LD 50 dan LC 50?

4. Kematian larva udang bisa disebabkan oleh apa?
5. Jika didapatkan kematian larva dikonsentrasi yang rendah tinggi, hasil ini bisa diartikan bahwa?

F. Referensi:

- Caroline Thomas, MB ChB FRCA, Andrew B Lumb, MB BS FRCA. 2012. Physiology of haemoglobin. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 12(5), 251-256, <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mks025>
- Chaudhry R, Usama SM, Babiker HM. Physiology, Coagulation Pathways. [Updated 2020 Sep 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482253/>
- Darelanko, Michael J, Auletta, Carol S., 2014. Handbook of Toxicology 3rd edition. CRC Press, USA.
- Dorothy, I. S. and W. R. (2012). Animal Models in Diabetes Research. *Animal Models in Diabetes Research*, 933, 219–228. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-068-7>
- Fitria, Laksmindra dan Mulyati Sarto. 2014. Profil Hematologi Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar Jantan dan Betina Umur 4, 6, dan 8 Minggu. *Biogenesis*, 2(2), 94-100
- Fox, G.J., Barthold, S.W., Davisson, M.T., Newcomer, C.E., Quimby, F.W., and Smith, A.L. 2007. *The Mouse in Biomedical Research*. Elsevier academic. San Diego.
- Gadir, S. A. (2012). Assessment of bioactivity of some Sudanese medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(12), 5145–5148.
- Hau, J., and Van Hoosier, G.L. 2003. *Handbook of Laboratory Animal Science 2^{ed}*. CRC press: New York.
- Kaplan, J. R., & Wagner, J. D. (2006). Type 2 diabetes-an introduction to the development and use of animal models. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 47(3), 181– 185. <https://doi.org/10.1093/ILAR.47.3.181>
- Kusumawati, E. Nova Lusiana, Ika Mustika, Sri Hidayati, dan Esti Novi Andriyani. 2018. Perbedaan Hasil Pemeriksaan Kadar Hemoglobin (Hb) Remaja Menggunakan Metode Sahli dan Digital (Easy Touch GCHb). *Journal of Health Science and Prevention*, 2(2), 95-98

- Lukman, Magfirah dan Christin, Vidya. 2020. Analisis Profil Bobot Badan Tikus dan Gejala Toksis Pada Pemberian Ekstrak Etanol Daun Parang Romang (*Boehmaeria virgata*) Terhadap Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Farmasi Galenika*, 6(1): 1-6.
- Nugroho, Rudy Agung. 2018. Mengenal Mencit Sebagai Hewan Laboratorium. Samarinda: Mulawarman University Press.
- Pasuraman S., Raveendran R., Kesavan R. 2010. Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 1(2), 87-93.
- Puspitasari, E. (2018). Toksisitas Ekstrak Metanol Kulit Jengkol (*Pithecellobium jiringa*) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test terhadap Larva Udang (*Artemia salina*). *Jurnal Biologi Tropis*, 18(1), 149–153. <https://www.neliti.com/publications/256399/toksisitas-ekstrak-metanol-kulit-jengkol-pithecellobium-jiringa-dengan-metode-brin>
- Rees, D. A., & Alcolado, J. C. (2005). Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*, 22(4), 359–370. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x>
- Refdanita., Veryanti, P.R., Wulandari, A., Muti, A.F., dan Sianturi, S. 2018. *Petunjuk Dan Paket Materi Praktikum Farmakologi*. Laboratorium Farmakologi Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Institut Sains Dan Teknologi Nasional Jakarta : Jakarta.
- Ridwan, E. 2013. Etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan. *J Indon Med Assoc*, 63(3), 112-6.
- Smith, J.B. dan S. Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Soegondo,S., 2009. Diagnosis dan Klasifikasi Diabetes Melitus Terkini. Dalam: Pradana Subekti dan Sidartawan Soegondo, 2009. *Penatalaksanaan Diabetes Melitus Terpadu*. Edisi 2. Cetakan ke-7. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, halaman 19-30.
- Suckow, M.A., Weisbroth, S.H., and Franklin, C.L. 2006. *The Laboratory Rat*. Elsevier academic press: London.
- Yu, Z., Kastenmüller, G., He, Y., Belcredi, P., Möller, G., Prehn, C., Mendes, J., Wahl, S., Roemisch-Margl, W., Ceglarek, U., Polonikov, A., Dahmen, N., Prokisch, H., Xie, L., Li, Y., Wichmann, H. E., Peters, A., Kronenberg, F., Suhre, K., Adamski, J., ... Wang-Sattler, R. (2011). Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PloS one*, 6(7), e21230. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021230>