

## BAB III

### SUBJEK DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Subjek/Bahan/Alat Penelitian

##### 3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan adalah tikus putih galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang dipilih melalui kriteria inklusi dan eksklusi:

1. Kriteria Inklusi<sup>20</sup>
  - a. Jenis kelamin betina
  - b. Tikus usia 8-12 minggu
  - c. Tikus yang dalam keadaan sehat
  - d. Tikus yang tidak sedang hamil
2. Kriteria Eksklusi

Tikus yang mengalami penurunan berat badan

##### 3.1.2 Bahan Penelitian

- a. Ubi jalar ungu

Ubi jalar ungu yang digunakan adalah ubi jalar ungu Murasaki yang dibeli di pusat perbelanjaan

- a. Pakan tikus

Pakan berbentuk pellet yang terdiri dari berbagai jenis tepung, biji, dan daun yang diberikan setiap hari

b. Darah Tikus

Sampel darah tikus yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari cardiac sebanyak 2.0 ml sebagai bahan pengukuran AST & ALT.

c. Reagen SGOT

Terdiri dari EDTA 5 mmol/L, 2-Oxoglutarate 12 mmol/L, L-Aspartate 200 mmol/L, MDH 495 UI/L, LDH 820 UI/L, NADH  $\leq$  0,18 mmol/L, tampon tris 80 mmol/L, PH 30° C

d. Reagen SGPT

Terdiri dari 2-Oxoglutarate 15 mmol/L, L-Alanine 500 mmol/L, LDH  $\geq$  1600 UI/L, NADH  $\leq$  0,18 mmol/L, Tris Buffer 100 mmol/L, PH 30° C

### 3.1.3 Alat Penelitian

a. Timbangan

Terdapat 2 timbangan yang digunakan pada penelitian ini, yaitu timbangan digital merek Acis dan timbangan digital Sartorius Ag.

b. Sarung tangan

Alat ini digunakan sebagai proteksi bagi peneliti pada saat melakukan pemberian ekstrak ubi jalar ungu secara per oral pada tikus.

c. Spidol dan label

Alat ini digunakan untuk memberi nama atau tanda pada hewan uji dan ekstrak ubi jalar ungu

d. Kandang tikus

Kandang tikus yang digunakan berupa bak plastik dengan luas alas kandang 77,4 cm<sup>2</sup> dan tinggi 12,7 cm menggunakan tutup kandang yang terbuat dari anyaman karet. Kandang tikus beralaskan sekam padi yang bersih dan diganti setiap hari. Suhu ruangan diatur 22°C (+ 3°C). Pencahayaan selama 12 jam terang 12 jam gelap<sup>20</sup>

e. Tempat pakan dan minum tikus

Tempat pakan dan minum yang digunakan berupa botol yang terbuat dari plastik.

f. *Syringe*

Alat ini digunakan untuk mengambil darah tikus.

g. Tabung penyimpanan darah dengan EDTA

Alat ini digunakan untuk menampung sampel darah tikus yang telah diambil dan mencegah penggumpalan.

### 3.1.4 Perhitungan Sampel

Penentuan sampel yang ditentukan sesuai dengan *guideline Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)* dengan menggunakan metode *Proposed new method* disimpulkan bahwa jumlah total hewan coba yang dibutuhkan berjumlah 13 yang dibagi menjadi tiga tahapan. Tahap pertama dibagi menjadi empat kelompok, tahap kedua dan ketiga dibagi menjadi tiga kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri atas satu ekor hewan. Dua ekor hewan coba digunakan untuk tes

konfirmasi dan sisanya satu ekor hewan coba digunakan sebagai kontrol.<sup>21</sup>

## 3.2 Metode Penelitian

### 3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental murni *in-vivo* dengan rancangan acak lengkap. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui efek ekstrak air ubi jalar ungu terhadap organ hepar berdasarkan pengukuran kadar AST & ALT. Penelitian ini memiliki tiga tahapan. Penelitian ini dimulai dengan tahap satu menggunakan empat kelompok percobaan dengan masing-masing kelompok menggunakan satu tikus dengan dosis 50 mg, 200 mg, 400 mg, dan 800 mg/kgBB. Tahap dua menggunakan 3 kelompok percobaan, masing-masing kelompok menggunakan satu tikus dengan dosis 1.000 mg, 1.500 mg, dan 2.000 mg/kgBB. Tahap tiga menggunakan tiga kelompok percobaan, masing-masing kelompok menggunakan satu tikus dengan dosis 3.000 mg, 4.000 mg, dan 5.000 mg/kgBB. Jika ditemukan hewan uji yang mati maka dilakukan tes konfirmasi untuk memvalidasi bahwa suatu substansi uji merupakan penyebab kematiannya dengan menggunakan 2 tikus yang diberikan dosis rendah yang menyebabkan kematian. Pengamatan harus dilakukan selama satu jam setelah pemberian dan 10 menit setiap interval dua jam selama 24 jam. Jika setidaknya satu dari dua hewan mati, maka hewan tersebut

berfungsi sebagai konfirmasi hasil tes.

**Tabel 3.1 Penentuan Dosis**

Tahap	Dosis Rekomendasi (mg/KgBB)			
	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4
1	50	200	400	800
2	1000	1500	2000	
3	3000	4000	5000	

Sumber : Enevide Chinedu, David Arome, Fidelis Solomon Ameh. (10)

Keterangan : mg = milligram; KgBB = kilogram berat badan

Hewan uji diberi perlakuan dan diamati selama 24 jam kemudian darah hewan uji diambil untuk melihat fungsi organ hepar berdasarkan kadar AST & ALT.

### 3.2.2 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Ekstrak ubi jalar (*Ipomoea batatas L*) ungu
2. Variabel terikat : Kadar AST & ALT.

### 3.2.3 Definisi operasional

**Tabel 3.2 Definisi Operasional**

No	Variabel	Definisi Operasional	Satuan	Skala
1	Dosis Ekstrak Air Ubi Jalar Ungu	Dosis ekstrak ubi jalar ungu sebesar 50, 200, 400, 800, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000 mg/kg BB (per oral)	mg/kgBB	Numerik
2	Kadar AST	Pada penelitian ini pengambilan darah diambil dari cardiac sebanyak 2 cc (hindari hemolisis) yang dimasukkan ke dalam tabung EDTA kemudian dikirim ke laboratorium	IU/L	Numerik
3	Kadar ALT	Untuk memeriksa kadar ALT juga dilakukan pengambilan darah dari cardiac sebanyak 2 cc (hindari hemolisis) yang dimasukkan ke dalam tabung EDTA kemudian dikirim ke laboratorium	IU/L	Numerik

**Keterangan: Mg = miligram : Kg = kilogram : BB = berat badan**

### 3.2.4 Prosedur Penelitian

#### a. Masa adaptasi tikus

Hewan uji yang sudah memenuhi kriteria inklusi diadaptasikan selama 7 hari. Selama diadaptasikan hewan uji ditempatkan pada kandang sesuai dengan *Guideline Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)*, dengan pencahayaan dan sirkulasi yang baik. Selama diadaptasikan hewan uji diberi pakan dan minum setiap hari

#### b. Uji toksisitas akut

Penelitian memiliki tiga tahapan, dimulai dengan tahap pertama dibagi menjadi empat kelompok dengan masing-masing kelompok

terdiri dari satu hewan uji. Masing-masing kelompok diberi dosis 50, 200, 400, dan 800 mg/kgBB. Tahap dua menggunakan 3 kelompok percobaan, masing-masing kelompok menggunakan satu tikus dengan dosis 1.000 mg, 1.500 mg, dan 2.000 mg/kgBB. Tahap tiga menggunakan tiga kelompok percobaan, masing-masing kelompok menggunakan satu tikus dengan dosis 3.000 mg, 4.000 mg, dan 5.000 mg/kgBB. Ketiga tahap ini diamati selama 24 jam.<sup>21</sup>

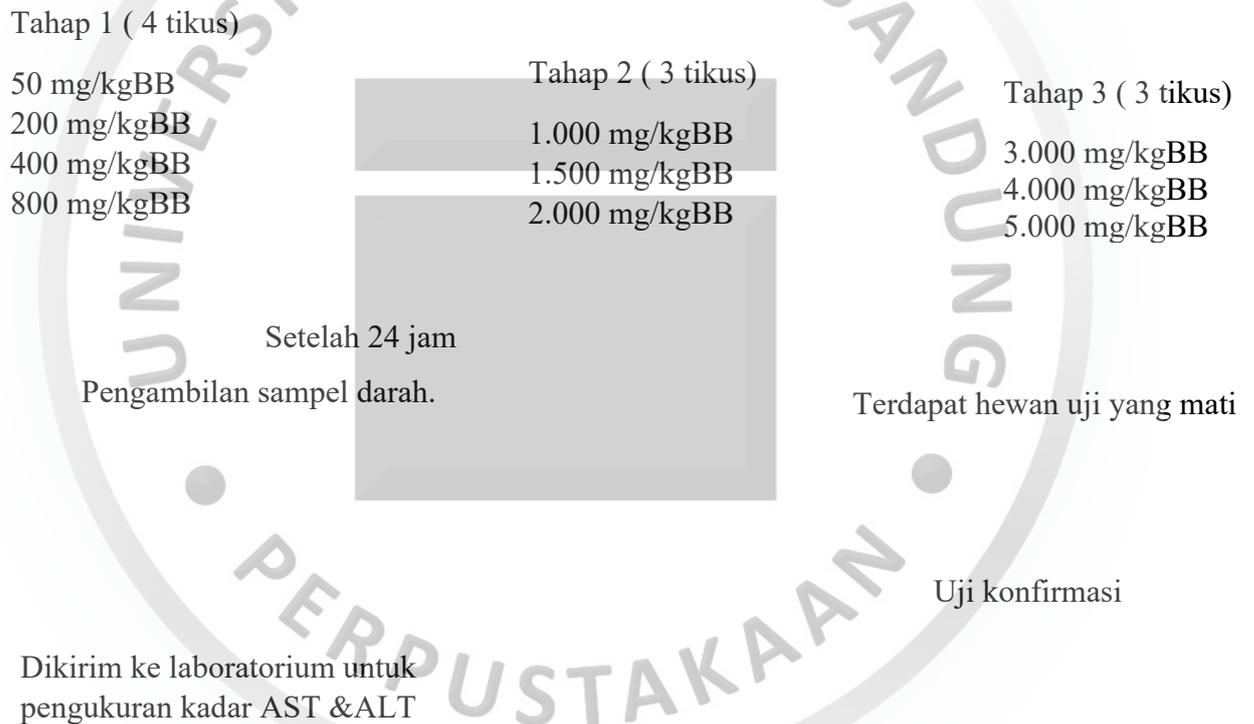
c. Pengambilan sampel darah

Darah diambil dari organ cardiac hewan uji sebanyak 2 cc kemudian ditampung dalam tabung yang sudah berisi EDTA. Kemudian darah yang telah diambil disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Jika serum tidak langsung diperiksa, maka harus disimpan pada lemari es suhu 2°C -8°C. dilanjutkan dengan tahap perhitungan AST dan reagen SGOT sebanyak 1mL ke dalam kuvet menggunakan mikropipet dengan skala yang sudah diatur sebelumnya. Kedua zat dicampur dan diinkubasi selama 5 menit dalam suhu ruang. Inkubasi ini dilakukan agar serum dan reagen bereaksi. Setelah diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang, campuran yang telah berisi reagen diukur selama 3 menit dengan kimia analyzer.

### 3.2.5 Alur Penelitian

Tikus yang memenuhi kriteria inklusi  
yang diadaptasikan selama 7 hari

Pembagian tahap dan kelompok perlakuan



Catat hasil yang di dapat

### 3.2.5 Analisis Data

Analisis data efek toksisitas ekstrak ubi jalar ungu terhadap organ hepar berdasarkan kadar AST & ALT akan dilakukan menggunakan uji analisis deskriptif dengan *propose new method modification*

### 3.2.7 Tempat dan Waktu Penelitian

#### a. Tempat penelitian

Dilakukan di laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung Jalan Hariangbanga No.1 Bandung.

#### b. Waktu penelitian

Maret – Juli 2019

### 3.2.8 Aspek Etika Penelitian

Penelitian ini terdapat dampak aspek etika, yaitu membuat ketidaknyamanan pada hewan uji karena perlakuan dan tindakan yang muncul selama penelitian berlangsung berupa efek toksik pada tikus ketika pemberian zat uji terkait melihat kadar AST & ALT.

Untuk mengatasi adanya dampak negatif, penelitian dilakukan dengan prinsip 3R, yaitu:

*Reduction*: penelitian ini memanfaatkan hewan uji dengan jumlah yang minimal, tetapi akan mendapatkan hasil yang maksimal. Penelitian ini menggunakan sampel sesuai dengan *proposed (new) recommended method* sebanyak 13 ekor tikus.

*Refinement:* selama penelitian berlangsung, hewan uji diletakkan di kandang tikus yang digunakan berupa bak plastik dengan luas alas kandang 77,4 cm<sup>2</sup> dan tinggi 12,7 cm menggunakan tutup kandang yang terbuat dari anyaman karet. Kebersihan kandang dijaga dengan baik dan tikus diberi makan dan minum setiap hari, serta ditempatkan di lingkungan yang bersih, suhu yang sesuai dengan standar, dan bersirkulasi lancar.

*Replacement:* penelitian ini menggunakan tikus sebagai hewan uji coba pengganti manusia. Pemilihan tikus karena memiliki karekteristik yang sama dengan manusia dan merupakan organisme dengan ordo yang rendah.