

BAB III

SUBJEK, BAHAN, ALAT, DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek, bahan, dan Alat penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah subjek yang datanya akan dimasukkan dalam analisis penelitian.³¹ Pada penelitian ini subjek yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*).

3.1.2 Populasi Penelitian

Kriteria subjek penelitian yang digunakan untuk penelitian harus memenuhi kriteria berikut:

a. Kriteria Inklusi

1. Tikus berjenis kelamin betina, penentuan jenis kelamin betina dikarenakan pada penelitian yang sudah dilakukan tikus betina memiliki sensitivitas yang lebih tinggi terhadap reaksi toksisitas akut dibandingkan tikus jantan. Walaupun, baik betina maupun jantan keduanya memunculkan manifestasi akut toksisitas.^{32,33}
2. Tikus dewasa muda dalam keadaan sehat, untuk memastikan kesehatan tikus, akan dilakukan pemeriksaan oleh dokter hewan.³³
3. Tikus tidak sedang hamil.³³
4. Usia tikus 8 hingga 12 minggu dengan berat 150-200 gram.³³

b. Kriteria Eksklusi

1. tikus berjenis kelamin jantan

2. tikus mati saat penelitian
3. tikus sedang hamil

3.1.3 Bahan Penelitian

1. Ubi jalar ungu (*Ipomea batatas* L)

Ubi jalar ungu yang digunakan adalah ubi jalar ungu Murasaki dari Jepang yang sudah tersertifikasi.

2. Bahan pakan normal

Pakan yang diberikan kepada tikus adalah pakan yang berbentuk pallet.

3. Akuades

Akuades digunakan sebagai bahan pelarut ekstrak ubi jalar ungu.

4. Ketamine HCl

Ketamine HCl digunakan untuk membius tikus.

3.1.4 Alat Penelitian

1. Timbangan
2. Kandang tikus

Kandang tikus yang akan digunakan berupa bak plastik dengan luas alas kandang 77.4 cm^2 , tinggi 12.7 cm menggunakan tutup kandang yang terbuat dari anyaman besi berukuran 0.5cm. Kandang tikus beralaskan sekam padi yang bersih dan diganti setiap hari, diletakkan dalam ruangan dengan suhu $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 3^0 \text{ C}$). Pencahayaan harus artifisial, 12 jam terang dan 12 jam gelap.³³

3. Tempat pakan dan minum

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

4. Sonde peroral

Sonde peroral digunakan untuk memberikan ekstrak air ubi jalar ungu dan akuades peroral kepada tikus selama masa perlakuan.

5. Sarung tangan

Sarung tangan digunakan untuk menjaga kebersihan dan melindungi peneliti dari gigitan tikus.

6. Spidol dan label

Spidol digunakan untuk menandai tikus. Label digunakan untuk menandai masing-masing kandang tikus

7. Jarum Suntik dan spuit

Digunakan untuk mengambil darah dan menampung darah yang sudah diambil dari tikus

8. Hematology Analyzer

Digunakan untuk mengetahui kadar Hb, leukosit dan trombosit darah tikus.

3.1.5 Penentuan Besar Sampel

Besar sampel pada penelitian ini ditentukan oleh *guideline Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)* dengan menggunakan metode *Proposed (new) method* membutuhkan 13 ekor tikus yang dibagi pada 3 tahapan dan tes konfirmasi. Pada metode tersebut penelitian dibagi menjadi 3 tahapan. Pada tahap pertama membutuhkan 4 ekor tikus yang akan dimasukan ke

grup berbeda dengan pemberian dosis yang berbeda. Pada tahap ke dua membutuhkan 3 ekor tikus dan tahap selanjutnya yaitu tahap ketiga membutuhkan 3 ekor tikus. Tahap ke 3 dilakukan hanya bila jika pada tahap ke 2 tidak ada tikus percobaan yang mati. Lalu, 1 ekor tikus akan digunakan sebagai kontrol. Sedangkan 2 ekor tikus lainnya digunakan sebagai cadangan bila terdapat tikus yang tidak memenuhi syarat sebagai sampel pada masa penelitian.²³

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan organisme hidup yaitu tikus sebagai subjek penelitian. Penelitian eksperimental yang dilakukan menggunakan pendekatan *in vivo* dengan teknik *random assignment* yaitu suatu metode penunjukan subjek sebagai sampel eksperimen yang di dasarkan bahwan semua subjek memiliki probabilitas yang sama.³¹

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menilai toksisitas akut dari pemberian efek ekstrak air ubi jalar ungu terhadap darah tikus. Penelitian dengan *proposed (new) method* membutuhkan tiga tahapan dan satu tes konfirmasi.²³

Hewan coba diamati selama 24 jam sampai didapatkan tikus percobaan yang mati. Setelah tikus percobaan mati, maka akan dilakukan pengambilan darah untuk menilai toksisitas ekstrak air ubi jalar ungu terhadap kadar hemoglobin, leukosit dan trombosit dalam darah.

3.2.2 Variable Penelitian

Variabel penelitian terdiri dari variable bebas dan variable terikat:

1. Variabel bebas: ekstrak air ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.*)
2. Variabel terikat: profil darah tikus
3. Variabel kontrol:
 - a. Hewan coba berjenis kelamin betina
 - b. Umur hewan coba 8-12 minggu
 - c. Hewan coba tidak dalam masa kehamilan
 - d. Hewan coba yang tidak diinduksi oleh ekstrak air ubi jalar ungu

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Satuan	Skala
1	Ekstrak air ubi jalar ungu	Ubi jalar yang di keringkan atau dijemur kemudian di ambil sedikit air ubi jalarnya.	Mg/KgBB Peroral	Numerik
2	Hemoglobin	Zat warna darah yang merupakan suatu rantai polipeptida dengan rantai α dan β globin terdapat pada sel darah merah. ²³	Gr/dl	Numerik
3	Leukosit	Leukosit mengandung nucleus dan sitoplasma dan terdapat lima jenis leukosit yang ditemukan dalam darah yaitu Neutrofil, Basofil, Eosinofil, Limfosit, dan Monosit. ¹³	/mm ³	Numerik
4	Trombosit	Jumlah platelet dalam darah	/mm ³	Numerik

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

3.2.3 Prosedur Penelitian

1. Pembuatan ekstrak air ubi jalar ungu
2. Uji toksisitas akut

Pada tahap pertama, merupakan tahapan inisial dan membutuhkan empat ekor tikus. Tikus akan dibagi ke dalam empat kelompok dan diberikan dosis ekstrak air ubi jalar ungu dengan dosis yang berbeda-beda yaitu 10, 40, 80, 160 mg/KgBB. Jika tidak ada tanda toksisitas akut atau mortalitas maka penelitian akan dilanjutkan ke tahap ke dua. Pada tahap ke dua membutuhkan tiga ekor tikus, yang akan dibagi ke dalam 3 kelompok. Masing-masing kelompok akan diberikan dosis ekstrak air ubi jalar ungu yang berbeda dan dosis yang diberikan lebih tinggi dibandingkan dosis tahap pertama yaitu 200, 300 dan 400 mg/KgBB. Tahapan ke tiga dilakukan bila pada tahapan kedua tidak ada tanda toksitas atau kematian tikus. Pada tahap ini membutuhkan tiga ekor tikus yang dibagi ke dalam 3 kelompok. Dosis yang diberikan pada tahap ini lebih tinggi dibandingkan tahap ke dua yaitu 600, 800, dan 1000 mg/KgBB. Tikus di observasi selama 24 jam untuk melihat efek toksisitas akut.

3. Pengambilan darah

Pengambilan darah dilakukan dengan menggunakan anestesi total bila tikus masih hidup. Selanjutnya darah akan diambil melalui pungsi kardiak agar jumlah dan kualitas darah yang diambil dalam kondisi baik dan cukup. Darah akan diambil dengan jarum nomor 19 hingga 25G menyesuaikan dengan ukuran tikus dan spuit 1cc. Lalu darah akan

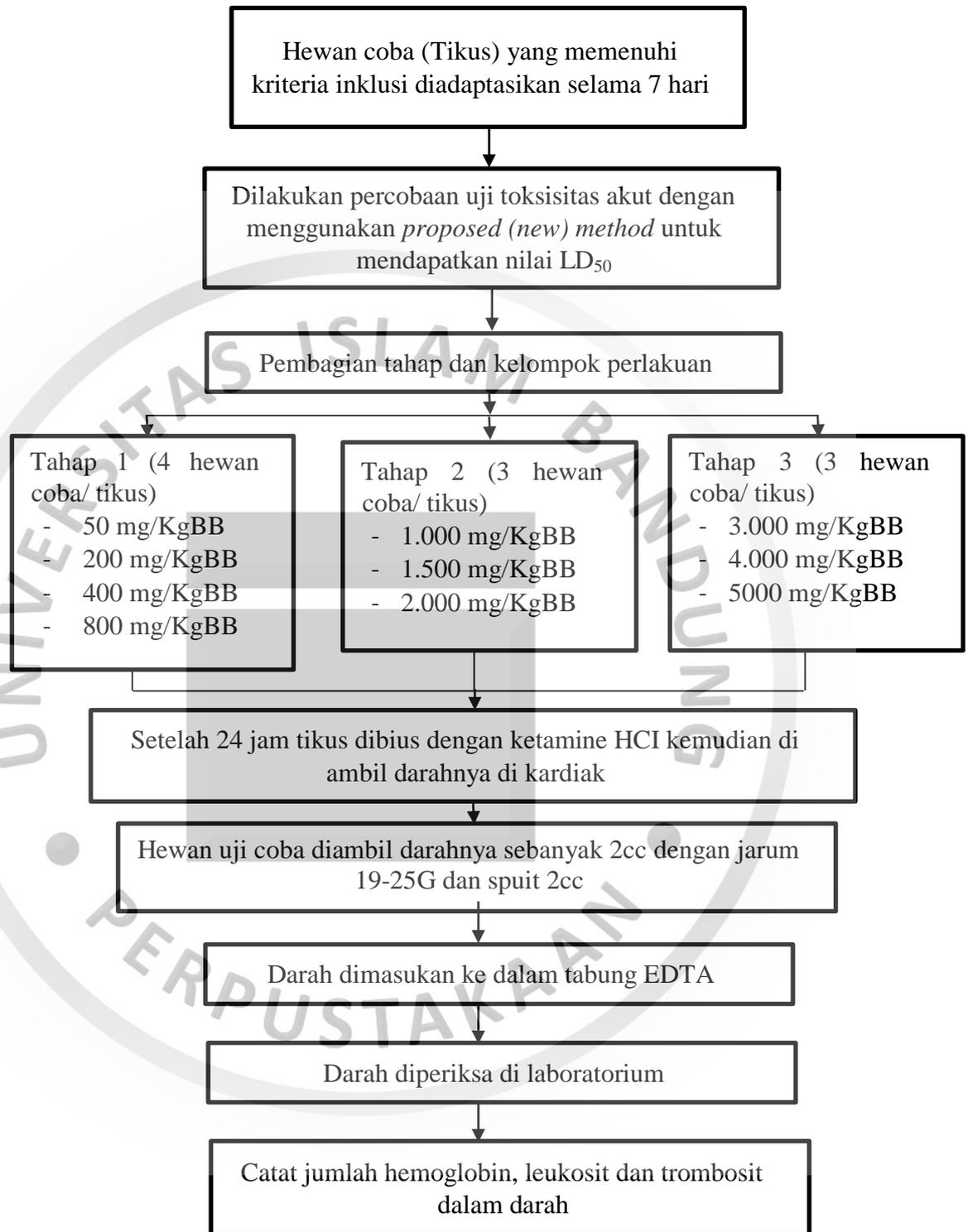
dimasukan ke dalam tabung EDTA yang mengandung antikoagulan agar darah tidak cepat membeku dan darah diperiksakan ke laboratorium.³⁴

4. Penghitungan Hematologi Darah

Darah yang diambil dari tikus akan dinilai jumlah hemoglobin, leukosit dan trombosit selama 24 jam pasca pemberian ekstrak air ubi jalar ungu dengan menggunakan alat Hematology Analyzer di laboratorium.



3.2.4 Alur Penelitian



3.2.5 Analisis Data

Data yang didapatkan dari penelitian akan dianalisis secara deskriptif dan korelasi dengan menggunakan teknik *pearson product moment*, dengan menggambarkan secara deskriptif dan menguji hubungan antara pemberian dosis dengan perubahan profil hematologi yang meliputi: hemoglobin, leukosit, dan trombosit setelah pemberian dosis ekstrak air ubi jalar ungu.

3.2.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di dua tempat, tempat untuk pemeliharaan dan pemberian ekstrak akan dilakukan di Laboratorium FK UNISBA. Sedangkan untuk pemeriksaan profil darah seperti hemoglobin, leukosit dan trombosit akan dilakukan di Laboratorium RSUD Cicalengka. Penelitian akan di mulai bulan februari tahun 2019.

3.2.7 Aspek Etik Penelitian

Penelitian ini berhubungan dengan hewan coba maka harus ditetapkan prinsip 3R sesuai Russell dan Burch yaitu, *replacement* pada penelitian ini adalah menggunakan tikus sebagai hewan yang di uji coba untuk dilakukan percobaan menggantikan percobaan pada manusia, *reduction* dengan memakai metode *proposed new methode* dengan jumlah tikus 13 ekor, *refinement* dengan perlakuan pada tikus saat menginduksi ekstrak dibantu oleh laboran yang berpengalaman untuk meminimalisir rasa sakit dan stres pada tikus dan setelah selesai pengambilan darah akan dikuburkan secara layak.

Hewan coba harus diperhatikan aspek-aspek perlakuan yang memungkinkan kesejahteraan hidup tikus sesuai prinsip 5F (*freedom*) yang ditetapkan oleh *Animal Welfare Coucil* adalah sebagai berikut.

1. *Freedom of Hunger and Thirst*

Tikus harus diberi makan dan minum sesuai dengan kebutuhannya agar bebas dari rasa lapar dan haus.

2. *Freedom from Discomfort*

Tikus harus diperlakukan sebaik mungkin dan nyaman-nyamannya supaya bebas dari ketidaknyamanan.

3. *Freedom of Pain, Injury or Disease*

Tikus harus dirawat dan diberi makan sesuai kebutuhannya dibantu oleh laboran yang berpengalaman untuk mencegah dari rasa sakit, cedera atau penyakit.

4. *Freedom to Fear and Distress*

Tikus harus dirawat sebaik mungkin dan membuat tikus nyaman dengan adaptasi selama 7 hari sebelum percobaan untuk meminimalisir rasa takut dan stres jangka panjang pada tikus.

5. *Freedom to Express Natural Behavior*

Tikus harus diberikan ruang kebebasan dan tidak dikekang supaya dapat mengekspresikan tingkah lakunya secara alami.