

BAB III

SUBJEK DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek/Bahan/Alat Penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

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

1. Kriteria Inklusi

- a. Jenis kelamin betina
- b. Tikus usia 8-12 minggu
- c. Tikus dalam keadaan sehat
- d. Tikus tidak sedang hamil
- e. Berat badan 131–191 gram

2. Kriteria Eksklusi

- a. Tampak sakit
- b. Tikus mengalami penurunan berat badan

3.1.2 Bahan Penelitian

- a. Ubi jalar ungu

Ubi jalar ungu yang digunakan akan dibeli di supermarket dengan varietas murasaki.

b. Pakan Tikus

Pakan berbentuk pellet yang diberikan setiap hari.

c. Darah Tikus

Sampel darah tikus yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari bagian ekor tikus sebanyak 0,5 ml sebagai bahan pembuatan sediaan apus darah tepi.

d. Akuades

Akuades digunakan sebagai pelarut untuk ekstrak ubi jalar ungu dan sebagai larutan kontrol

e. Metanol

Metanol digunakan untuk fiksasi.

f. Larutan Giemsa

Larutan Giemsa digunakan untuk mewarnai sediaan apus darah tepi

g. Air suling

Air suling digunakan untuk membilas sediaan setelah pemberian pewarnaan Giemsa.

3.1.3 Alat Penelitian

a. Timbangan

Terdapat dua 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 member 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 cm² dan tinggi 12,7 cm menggunakan tutup kandang yang terbuat dari anyaman karet. Kandang mencit beralaskan sekam padi yang bersih dan diganti setiap hari. Suhu ruangan diatur 22°C (+ 3°C). Pencahayaan selama 12 jam terang 12 jam gelap.¹⁵

e. Tempat pakan dan minum tikus

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

f. Tabung penyimpanan darah dengan EDTA

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

g. Slide

Slide digunakan sebagai tempat pembuatan sediaan apus darah tepi

h. Pipet

Pipet digunakan untuk meneteskan darah pada slide.

i. Mikroskop cahaya

Mikroskop cahaya digunakan untuk pengamatan morfologi eritrosit pada sediaan apus darah tepi.

3.1.4 Perhitungan Sampel

Penentuan sampel yang ditentukan sesuai dengan *guideline Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)* tentang oral toksisitas akut dengan menggunakan metode *Proposed new method* disimpulkan bahwa jumlah total hewan coba yang dibutuhkan 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 sisa satu ekor hewan coba digunakan sebagai kontrol.¹⁵

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 morfologi eritrosit melalui pengamatan sedimen apus darah tepi. 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 tiga kelompok percobaan, masing-masing kelompok menggunakan satu tikus dengan dosis 1.000 mg, 1.500 mg, dan 2.000 mg/kgBB.⁴

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

menggunakan dua tikus dengan diberikan dosis rendah yaitu 50 mg/kgBB yang menyebabkan kematian pada tikus.⁴

Tabel 3. 1 Pembagian Dosis

Tahap	Dosis Rekomendasi (mg/KgBB)			
	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4
1	50	200	400	800
2	1.000	1.500	2.000	
3	3.000	4.000	5.000	

Sumber : Enegide Chinedu, David Arome, Fidelis Solomon Ameh.⁴

Keterangan : mg = milligram; KgBB = kilogram berat badan

Hewan uji diberi perlakuan dan diamati selama 24 jam kemudian darah hewan uji diambil melalui pengamatan sediaan apus darah tepi lalu hewan uji dilihat morfologi eritrositnya apakah terdapat perubahan pada bentuk, warna, dan ukuran.

3.2.2 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Ekstrak ubi jalar (*Ipomoea batatas L.*) ungu

2. Variabel terikat

Morfologi eritrosit

Tabel 3. 2 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala
1.	Ekstrak air ubi jalar ungu	Pemisahan zat target dan zat yang tidak terpakai dimana teknik pemisahan berdasarkan perbedaan distribusi zat terlarut antara dua pelarut atau lebih yang saling bercampur.	mg/kgBB	Numerik
2.	Dosis Ekstrak Air Ubi Jalar Ungu	Dosis 50, 200, 400, 800, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, dan kontrol ekstrak air ubi jalar ungu	mg/kgBB	Numerik
3.	Morfologi Sel Darah Merah	<p>a. Variasi bentuk (<i>poikilocytosis</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Normal: bulat - <i>Spherocytes</i>: Tidak memiliki central pallor - <i>Stomatocytes</i>: central pallor berbentuk <i>mouth-like</i> - <i>Ovalocytes</i>: berbentuk <i>egg-shaped</i> - <i>Elliptocytes</i>: berbentuk seperti pensil, batang, dan rokok. - <i>Sickle cell</i>: eritrosit seperti bulan sabit. - <i>Burr cell</i>: eritrosit seperti spikula - Sel target: sel terlihat seperti target <p>b. Variasi ukuran (<i>anisocytosis</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Normositer: sama dengan inti limfosit kecil - Mikrositer: lebih kecil daripada inti limfosit kecil - Makrositer: lebih besar daripada inti limfosit <p>c. Variasi Warna</p> <ul style="list-style-type: none"> - Normokrom: $central\ pallor < \frac{1}{3}$ ukuran - Hipokrom: $central\ pallor > \frac{1}{3}$ sel - Hiperkrom: $central\ pallor < \frac{1}{3}$ sel - Polikromasia: eritrosit <i>grey-blue</i> 		Kategorik
				Kategorik

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

3.2.3 Prosedur Penelitian

a. Pembuatan ekstrak ubi jalar ungu

Pembuatan ekstrak air buah pepaya muda dilakukan di Laboratorium Pusat Antar Universitas – Ilmu Hayati Institut Teknologi Bandung (PAU- IH ITB).

Ubi jalar ungu disortasi kemudian dikupas kulitnya sehingga yang digunakan hanya dagingnya saja, dilanjutkan dengan membersihkan dan memotong ubi jalar ungu lalu dimasukkan ke dalam kantong. Ubi jalar ungu yang sudah dipotong dimasukkan ke dalam panci yang berisi air dan direbus selama satu jam. Ekstrak yang sudah encer dipindahkan ke dalam *waterbath*. Proses dilakukan secara terus menerus hingga senyawa terekstraksi sempurna. Ekstrak yang sudah kental dipindahkan ke tempat pengeringan, lalu dimasukkan ke dalam oven hingga kering. Ekstrak dihaluskan dan siap digunakan.

b. 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), tentang oral toksisitas akut dengan pencahayaan dan sirkulasi yang baik. Selama diadaptasikan hewan uji diberi pakan dan minum setiap hari.

c. 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. ⁴

d. Pengambilan darah dan pembuatan sediaan apus darah tepi

Darah diambil dari bagian ekor hewan uji sebanyak 0,5 ml kemudian ditampung dalam tabung yang sudah berisi EDTA.

Satu tetes sampel darah diteteskan dengan menggunakan pipet 2-3 mm dari ujung *objek glass*. *Objek glass* diletakkan dengan sudut 30-45° di depan tetes darah, lalu *objek glass* ditarik ke belakang menyentuh tetes darah tunggu sampai darah menyebar pada sudut tersebut. *Objek glass* digerakkan dengan cepat sehingga terbentuk apusan darah sepanjang 3-4 cm. Sediaan dibiarkan kering di udara dan diletakkan di atas rak pewarnaan. Metanol diteteskan diatas sediaan sehingga bagian yang terlapis darah tertutup seluruhnya, biarkan selama 2-3 menit kemudian keringkan. Sediaan apus darah tepi diliputi dengan larutan Giemsa di seluruh permukaan dan biarkan selama 20-30 menit, lalu setelah 20-30 menit dibilas dengan air suling. Sediaan apus darah tepi diletakkan dan dibiarkan mengering di udara.

e. Pengamatan morfologi sel darah merah pada sediaan apus darah tepi

- Observasi dengan pembesaran kecil (10x)

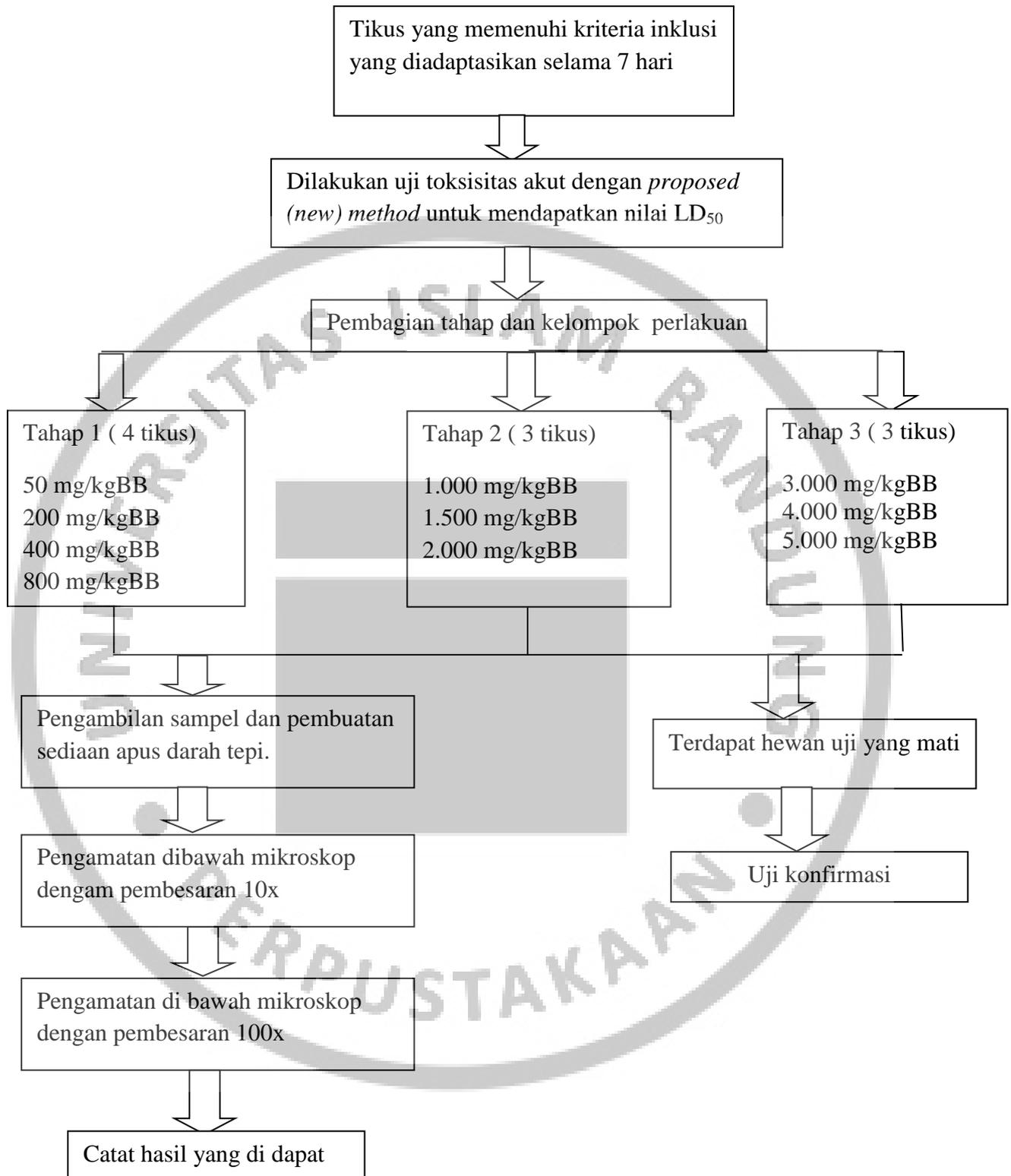
Pengamatan dilihat pada daerah ekor sediaan dan memastikan penyebaran sel darah rata dan tidak ada sel yang menggumpal, lalu lihat gambaran eritrosit yang tidak saling bertumpukan satu sama lain dan lihat yang memiliki *central pallor*.

- Observasi dengan pembesaran lensa objektif (100x)

Minyak imersi diteteskan satu tetes pada objek glass yang sudah ditandai pada pengamatan pmbesaran lensa objektif 100x setelah itu diamati morfologi eritrosit dari bentuk, ukuran, dan warna apakah terdapat perubahan atau tidak.



3.2.4 Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian

3.2.5 Analisis Data

Analisis data efek toksik ekstrak ubi jalar ungu terhadap morfologi eritrosit dengan menggunakan sediaan apus darah tepi. Data dari hasil morfologi eritrosit merupakan analisis secara deskriptif yang dilakukan oleh expert dalam bidangnya.

3.2.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung Jalan Hariang Banga No.1 Bandung. Penelitian dilakukan dari bulan Maret 2019 hingga bulan Desember 2019.

3.2.7 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 morfologi eritrosit.

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 cm² 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 organism dengan ordo yang rendah.

Akhir penelitian ini tikus akan diberikan obat anasthesi dosis tinggi agar mati dengan cepat untuk menghindarkan penderitaan pada tikus akibat penelitian yang sudah dilakukan.

