

BAB III

SUBJEK, BAHAN, DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus Novergicus*) betina galur Swiss.

3.1.1 Populasi Penelitian

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

a. Kriteria Inklusi

1. Tikus berjenis kelamin betina.^{27, 28}
2. Tikus dalam keadaan sehat, dapat dilihat dari bulu yang halus, bersih, tidak rontok, dan dapat bergerak aktif
3. Usia tikus 8-12 minggu.
4. Berat badan tikus 131-191 gram^{29, 32}

b. Kriteria Eksklusi

1. Tikus mengalami penurunan berat badan 10% pada saat adaptasi.
2. Tikus mati saat adaptasi.

3.1.2 Bahan Penelitian

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

Ubi jalar ungu yang digunakan adalah ubi jalar ungu jepang variasi murasaki, didapat dari Pasar Sederhana Bandung dengan tingkat kematangan yang dapat dilihat pada ubi jalar ungu yaitu, bagian kulit ubi yang tidak rusak, ubi jalar ungu yang lembut apabila ditekan.

2. Bahan pakan normal

Pakan yang diberikan kepada tikus adalah pakan yang berbentuk pelet, dengan jumlah sebanyak 8 kg. Pemberian pakan setiap 1 hari adalah sebanyak 1 kg yang akan diberikan pada 13 tikus.

3. Akuades

Akuades digunakan sebagai bahan pelarut ekstrak air ubi jalar ungu, dan untuk akuades yang digunakan adalah sebanyak 5 mL akuades/gram ubi jalar ungu.

4. Ketamin

Ketamin digunakan untuk membius tikus, dan jumlah dosis yang akan digunakan adalah sekitar 0,2 cc untuk setiap satu tikus nya.

5. Formalin

Formalin 4-10% yang akan digunakan untuk mengawetkan organ setelah dilakukan pembedahan pada satu organ tikus.

6. Pewarna *Hematoxylin Eosin* (HE)

Digunakan untuk mewarnai preparat histologi hepar tikus dan untuk pewarnaan adalah 1 botol.

3.1.3 Alat Penelitian

1. Timbangan

Timbangan yang digunakan untuk menimbang tikus adalah timbangan dengan merek yang tersedia, dengan kapasitas maksimal 1000 gram dan timbangan yang digunakan untuk menimbang organ dan ekstrak adalah timbangan dengan merek yang tersedia, dengan skala terkecil 0,0001 dengan kapasitas maksimal 210 gram.

2. Kandang Tikus

Kandang tikus yang akan digunakan berupa bak plastik dengan luas alas kandang 77,4 cm², tinggi 12,7 cm menggunakan tutup kandang yang terbuat dari anyaman besi berukuran 0,5 cm. Kandang tikus beralaskan sekam padi yang bersih dan diganti setiap hari, diletakkan dalam ruangan dengan suhu 22 °C. Pencahayaan harus artifisial, 12 jam terang dan 12 jam gelap.²⁹

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. Pisau bedah

Digunakan untuk membedah hewan uji coba yang akan diambil bagian organnya.

8. Botol

Merupakan tempat penyimpanan organ hepar tikus setelah pembedahan.

9. Slide

Slide merupakan tempat untuk meletakkan sampel histologi hepar tikus yang akan diamati, untuk jumlah slide yang akan digunakan adalah 15 slide.

10. Mikroskop

Mikroskop cahaya digunakan untuk melihat gambaran histologi hepar yang ada pada slide.

3.1.5 Penentuan Jumlah Sampel

Penentuan jumlah sampel yang ditentukan sesuai dengan *guideline Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)* dengan

menggunakan metode *Proposed new method* disimpulkan bahwa jumlah total hewan coba yang dibutuhkan tiga belas ekor yang dibagi menjadi tiga tahapan.²⁷⁻³¹

Tahap 1 : 4 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri atas satu hewan coba

Tahap 2 : 3 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri atas satu hewan coba

Tahap 3 : 3 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri atas satu hewan coba

Kontrol : 1 hewan coba yang digunakan sebagai kontrol negatif

Konfirmasi : 2 Hewan coba yang digunakan sebagai tes konfirmasi, apabila terdapat tikus yang mati pada tahap dan dosis tertentu

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental murni *in-vivo* dengan teknik pemilihan random alokasi yang didefinisikan sebagai rancangan dengan pemilihan sampel yang akan diujikan secara acak sesuai dengan jumlah sampel. Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah *post test only with randomized control group design* atau pengukurannya dilakukan sesudah hewan uji coba diberikan perlakuan.

3.2.2 Variable Penelitian

Variabel penelitian terdiri dari variable bebas dan variable terikat:

1. Variabel bebas: ekstrak air ubi jalar (*Ipomoea batatas L.*) ungu
2. Variabel terikat: gambaran nekrosis hepar
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 mengalami gangguan pada hepar sebelumnya.

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Satuan	Hasil Pengukuran	Skala Pengukuran
1.	Uji Toksisitas Akut	Uji toksisitas merupakan uji yang dilakukan untuk memperkirakan risiko yang berkaitan dengan pemaparan zat kimia dan mencari dosis toksik dari suatu zat tertentu. ²⁷	Mg/KgBB	Tahap 1: - 50 Mg/KgBB, - 200 Mg/KgBB, - 400 Mg/KgBB, - 800 Mg/KgBB Tahap 2: - 1000 Mg/KgBB - 1500 Mg/KgBB - 2000 Mg/KgBB Tahap 3: - 3000 Mg/KgBB, - 4000 Mg/KgBB, - 5000 Mg/KgBB	Numerik
2.	Nekrosis Koagulativa	Nekrosis Koagulativa merupakan nekrosis yang terjadi pada sel hepatosit hepar, nekrosis koagulativa merupakan nekrosis yang akut dan dapat terjadi dalam 24 jam, pada sel hepatosit akan tampak inti sel yang hilang, dan akan terdapat zona yang piknotik dengan warna yang pucat. ^{6,26}	-	1. Ya 2. Tidak	Kategorik

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

3.2.3 Prosedur Penelitian

1. Pembuatan ekstrak air ubi jalar ungu

Pengekstrakan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Padjajaran Bandung. Ubi jalar ungu akan dipotong-potong menjadi bentuk seperti dadu, lalu dimasukkan ke dalam kantung yang akan dimasukkan ke dalam panci yang berisi air. Rebus selama satu jam, lalu pindah kan ekstrak encer ke dalam *waterbath*.

Proses yang sama dilakukan secara terus menerus (6-7 kali) hingga semua senyawa terekstraksi sempurna yang dibuktikan dengan pengujian secara kimia. Larutan ekstrak yang telah menjadi kental dipindahkan ke baki pengeringan, kemudian masukkan ke dalam oven pada suhu 50°C – 60°C hingga kering. Ekstrak kemudian dihaluskan dan siap untuk digunakan.

2. Uji toksisitas akut

Tahapan penelitian:

1. Tahap pertama dibagi menjadi empat kelompok dengan setiap kelompok terdiri atas tiga hewan coba yang diberikan dosis 50, 200, 400, dan 800 mg/KgBB.
2. Tahap kedua dilanjutkan karena tidak ditemukan hewan coba yang mati, yang dibagi menjadi tiga kelompok dengan setiap kelompok terdiri atas tiga hewan coba yang diberikan dosis 1000, 1.500, dan 2000 mg/KgBB.

3. Tahap ketiga dilanjutkan karena tidak ditemukan hewan coba yang mati, yang dibagi menjadi tiga kelompok dengan setiap kelompok terdiri atas tiga hewan coba yang diberikan dosis 3000, 4000, dan 5000 mg/KgBB.

Setelah hewan coba selesai diamati selama 24 jam, seluruh hewan coba yang diberi perlakuan akan dilakukan pembedahan untuk pengambilan organ hepar yang akan diletakan sampelnya di *slide* dan akan diberikan pewarna *Hematoxylin Eosin* (HE) yang fungsinya untuk melihat gambaran hepar secara histopatologi.²⁷

Tabel 3.2 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.³⁶ Keterangan : mg = milligram; KgBB = kilogram berat badan

3. Pengambilan organ

Setelah hewan coba diuji, selanjutnya hewan coba dibius dengan menggunakan ketamin, sehingga nantinya akan membuat hewan coba tersebut menjadi pingsan.

Selanjutnya hewan coba dibedah dengan menggunakan pisau bedah, organ hepar pada hewan coba akan diambil dan di masukan pada botol yang berisi cairan formalin. Organ hepar selanjutnya dibawa ke Laboratorium Patologi Universitas Padjajaran, untuk pembuatan preparat histopatologi.

4. Pembuatan preparat

- a. Fiksasi: proses dilakukan setelah mengambil jaringan dan di masukan ke dalam gelas piala yang sudah diberikan cairan formalin untuk mencegah proses autolisis.
- b. *Trimming*: setelah jaringan di fiksasi maka akan dipotong kecil-kecil sesuai dengan ukuran yang memadai dan akan disimpan di fiksatif kontainer.
- c. *Pre-embedding*: jaringan akan dilakukan proses dehidrasi dengan direndam di larutan alkohol setelah itu kan di infiltrasi oleh parafin.
- d. *Embedding*: jaringan yang sudah di infiltrasi oleh parafin diposisikan di dalam cetakan dasar logam yang sudah berisi parafin yang sudah meleleh dan kemudian tempatkan di permukaan yang dingin.
- e. *Sectioning*: setelah itu parafin blok akan dipotong dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5 μm dan harus didekatkan dengan *waterbath* dengan suhu 45 ° C supaya mengembangkan potongan jaringan
- f. *Staining and mounting*: dilakukan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)
- g. *Storage of paraffin blocks and slide*
- h. Pengamatan histopatologi hepar

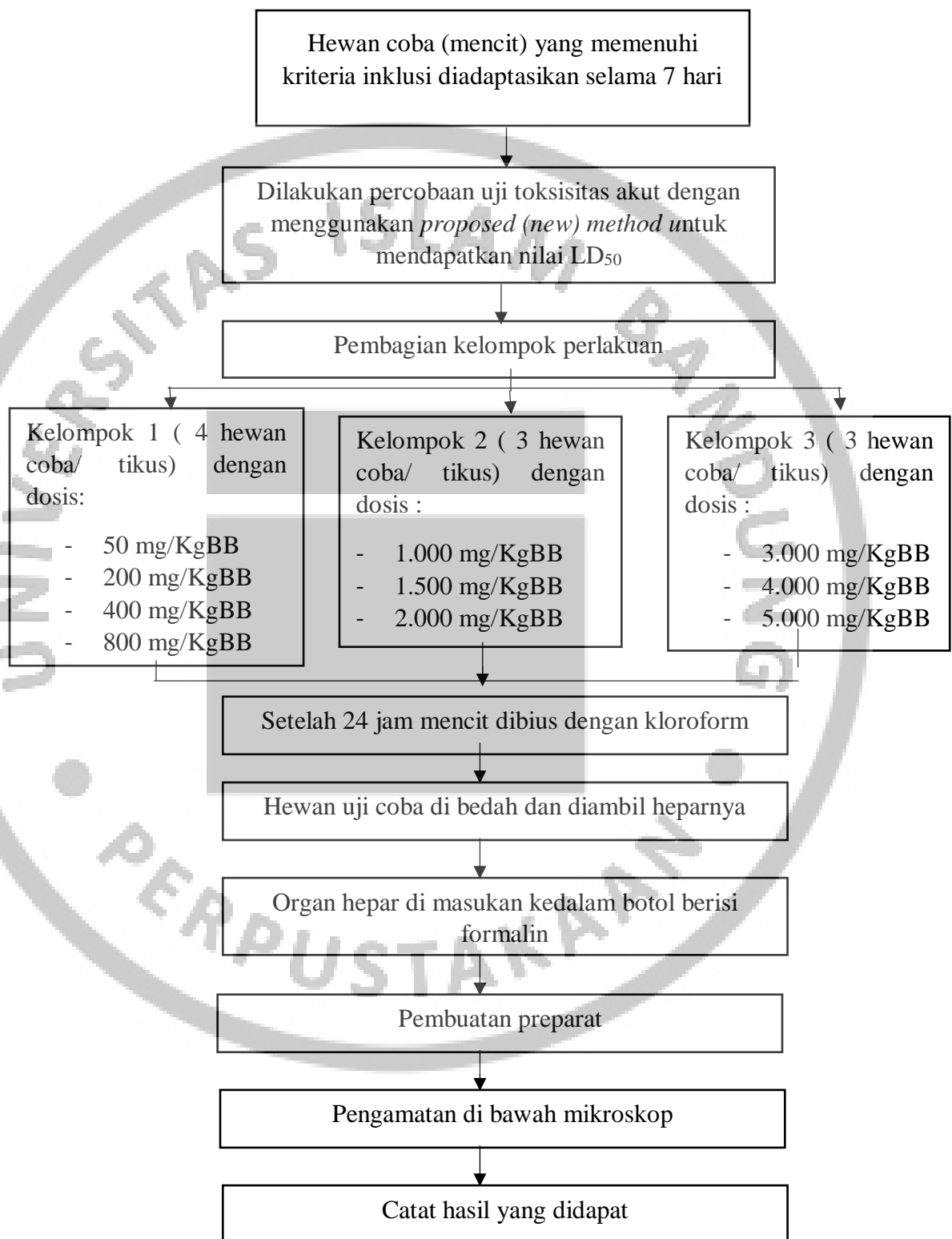
Pengamatan histopatologi hepar diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran lensa objektif 40x sampai dengan 100x, hasil pengamatan ini diamati oleh tenaga medis yang memahami tentang gambaran patologi anatomi dari hepar, dan dilihat apakah terdapat gambaran nekrosis koagulativa:

Nekrosis Koagulativa :

Nekrosis Koagulativa merupakan nekrosis yang terjadi dalam waktu 24 jam, nekrosis ini mempunyai gambaran yang bervariasi mulai dari intensitas yang mengenai dan melibatkan sebagian kecil satu zona asinar hingga mengenai nekrosis di seluruh asinus. Terdapat banyak sel-sel radang, sel limfosit, akan tampak sel hepatosit yang kehilangan intinya, dan terdapat area yang berwarna lebih pucat. ²⁵



3.2.4 Alur Penelitian



3.2.5 Analisis Data

Analisis data gambaran nekrosis koagulative hepar pada hewan coba (tikus) merupakan analisis secara deskriptif, setelah didapatkan hasil penelitian maka data tersebut akan dikelola dengan menggunakan *Microsoft Excel* dalam bentuk tabel.

3.2.6 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.6.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung, dan pembacaan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung.

3.2.6.2 Waktu Penelitian

Tabel 3.2 Waktu Penelitian

Kegiatan	2019										
	Januari	Februari	Maret	April	Juni	Juli	Agustus	September	November		
Perencanaan penelitian	■										
Sidang usulan penelitian		■									
Perizinan penelitian			■								
Pengembangan data				■							
Analisis data					■						
Penulisan skripsi								■			
Penulisan hasil penelitian									■	■	

3.2.7 Tempat dan Waktu Penelitian

Adaptasi tikus, pembuatan ekstrak ubi jalar ungu dilakukan di laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung. Pembuatan preparat dilakukan di Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung, dan penelitian dilakukan dari bulan Februari hingga Juni 2019

3.2.8 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^{38,42}

Selain itu harus menetapkan dan memperhatikan aspek-aspek perlakuan yang memungkinkan kesejahteraan hidup tikus sesuai prinsip 5F (*freedom*) yang ditetapkan oleh *Animal Welfare Council* adalah sebagai berikut^{38,42}

- *Freedom of hunger and thirst*

Tikus harus diberi makan dan minum sesuai dengan kebutuhannya agar bebas dari rasa lapar dan haus. Tikus harus diperlakukan sebaik mungkin dan nyaman-nyamannya supaya bebas dari ketidaknyamanan.

- *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.

- *Freedom to fear dan 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.

- *Freedom to express natural behavior*

Tikus harus diberikan ruang kebebasan dan tidak dikekang supaya dapat mengekspresikan tingkah lakunya secara alami.^{38, 42}

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 HASIL PENELITIAN

Penelitian telah dilakukan mengenai uji toksisitas akut ekstrak air ubi jalar (*Ipomea Batatas L.*)