

BAB III

SUBJEK, BAHAN, DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek Penelitian

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

3.1.1 Populasi Penelitian

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

a. Kriteria Inklusi

1. Tikus putih berjenis kelamin betina galur wistar.
2. Tikus dalam keadaan sehat (memiliki bulu yang halus, bersih, dan tidak rontok, bergerak aktif, dan dapat berinteraksi dengan tikus lain).
3. Usia tikus 8–12 minggu.
4. Berat badan 180–200 gram.

b. Kriteria Eksklusi

1. Tikus mati saat penelitian.
2. Tikus dengan penurunan berat badan 10% saat adaptasi.

3.1.2 Bahan Penelitian

1) Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.*)

Ubi jalar ungu yang digunakan adalah ubi jalar jepang variasi murasaki.

2) Bahan Pakan Normal

Pakan yang diberikan kepada tikus adalah pakan yang berbentuk pelet.

3) Akuades

Akuades digunakan sebagai bahan pelarut ekstrak air ubi jalar ungu.

4) Ketamin

Ketamin digunakan untuk membius tikus.

5) Formalin

Digunakan untuk mengawetkan organ setelah dilakukan pembedahan.

6) Kit Pewarna *Hematoxylin Eosin* (HE)

Digunakan untuk mewarnai preparat histologi hepar tikus.

3.1.3 Alat Penelitian

1) Timbangan

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

2)Kandang tikus

Kandang tikus yang akan digunakan berupa bak plastik dengan panjang kandang 33,5 cm, tinggi 11,5 cm, lebar 25,5 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°C. Pencahayaan harus artifisial, 12 jam terang dan 12 jam gelap.⁵⁶

3)Tempat Pakan dan Minum

Tempat pakan dan minum yang digunakan berupa botol plastik.

4)Pisau Bedah

Digunakan untuk membedah hewan coba yang akan diambil organnya.

5)Sonde Peroral

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

6)Sarung Tangan

Digunakan untuk menjaga kebersihan dan melindungi dari gigitan tikus.

7)Spidol dan Label

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

8)Gelas Piala

Gelas piala merupakan tempat penyimpanan organ hepar tikus setelah pembedahan.

9)Gelas Objek

Gelas objek merupakan tempat untuk meletakkan sampel histologi hepar tikus yang akan diamati.

10) Mikroskop cahaya

Mikroskop cahaya digunakan untuk melihat gambaran histologi hepar yang ada pada *slide* adalah mikroskop binokuler dengan merek olympus CX23.

3.1.4 Penentuan Jumlah Sampel

Penentuan jumlah sampel yang ditentukan menggunakan metode *Proposed new method* dengan jumlah total hewan coba yang dibutuhkan tiga belas 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 tidak di berikan perlakuan atau digunakan sebagai kontrol.³⁰

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental *in-vivo* dengan teknik pemilihan sampel 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 coba diberikan perlakuan.

3.2.2 Variabel Penelitian

Variabel yang di gunakan pada penelitian ini adalah gambaran steatosis atau perlemakan pada organ hepar hewan tikus.

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Skala Ukur	Skala
1	Gambaran steatosis	Steatosis merupakan suatu keadaan sitoplasma pada sel hepatosit terakumulasi oleh lipid yang berdasarkan ukurannya terdiri atas dua kelompok, yaitu. Makrovesikular: tetes lipid yang besar disertai dengan inti hepatosit yang terdorong ke perifer Mikrovesikular: tetes lipid kecil tanpa ada perpindahan inti hepatosit.	(+):Ditemukan (-):Tidak ditemukan	Kategorik
2.	<i>Ballooning degeneration</i>	hepatosit yang mengalami pembesaran, berbentuk bulat dan sitoplasma yang memiliki badan inklusi yang ditemukan dalam sitoplasma. ³⁴ .	(+):Ditemukan (-):Tidak ditemukan	Kategorik
3.	Pelebaran sinusoid	Pelebaran dari kapiler hepar	(+):Ditemukan (-):Tidak ditemukan	Kategorik
4.	Inflamasi sel hepatosit	Ditemukan sel radang berupa PMN pada jaringan hepar (daerah portal, periportal, dan lobus hepar)	(+):Ditemukan (-):Tidak ditemukan	Kategorik

3.2.3 Prosedur Penelitian

1) Pembuatan Ekstrak Air Ubi Jalar Ungu

Ubi jalar ungu akan dibuat ekstrak airnya. Pengekstrakan akan 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 digunakan.

2) Uji Toksisitas Akut

Penelitian ini menggunakan 13 hewan coba dengan satu hewan coba tidak diberikan perlakuan atau diberikan dosis 0 mg/KgBB, dua hewan coba untuk tes konfirmasi, dan sepuluh hewan coba akan dibagi berdasarkan tiga tahapan:

- 1) tahap pertama dibagi menjadi empat kelompok dengan setiap kelompok terdiri atas satu hewan coba yang diberikan dosis 50, 200, 400, dan 800 mg/KgBB.^{30,32}
- 2) tahap kedua akan dilanjutkan jika tidak ditemukan hewan coba yang mati yang dibagi menjadi tiga kelompok dengan setiap kelompok terdiri atas satu hewan coba yang diberikan dosis 1000, 1.500, dan 2000 mg/KgBB.^{30,32}
- 3) tahap ketiga akan dilanjutkan jika tidak ditemukan hewan coba yang mati yang dibagi menjadi tiga kelompok dengan setiap kelompok

terdiri atas satu hewan coba yang diberikan dosis 3000, 4000, dan 5000 mg/KgBB.^{30,32}

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 : Enegide Chinedu, David Arome, Fidelis Solomon Ameh.³⁰

Keterangan : mg = milligram; KgBB = kilogram berat badan

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.

3) Pengambilan Organ

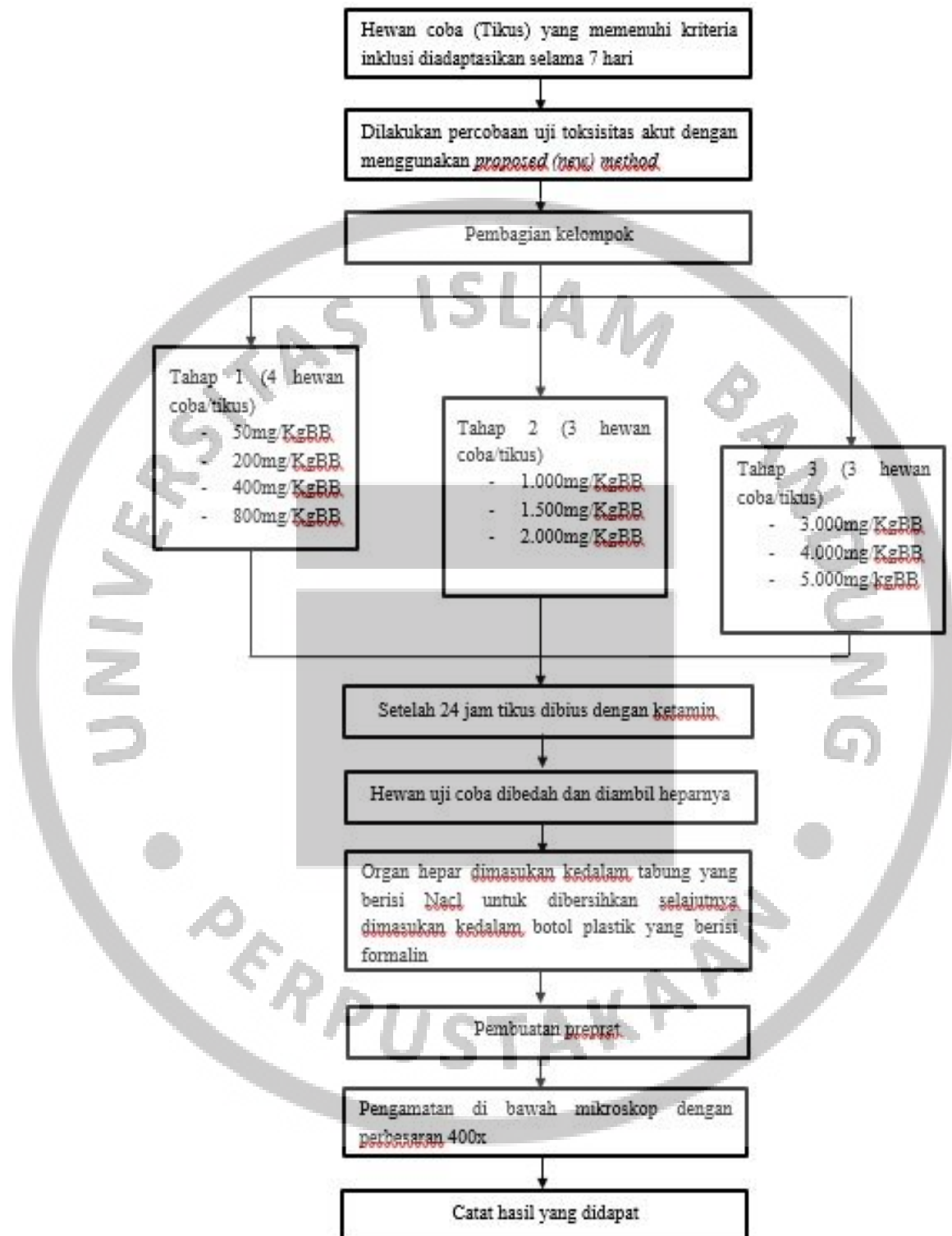
Setelah hewan coba diuji, selanjutnya hewan coba akan dibius dengan menggunakan ketamin, sehingga hewan cobanya akan pingsan. Selanjutnya hewan coba akan dibedah dengan menggunakan pisau bedah, organ heparnya akan diambil dan akan dimasukkan pada botol yang berisi cairan formalin. Organ hepar selanjutnya akan dibawa ke Laboratorium Patologi Universitas Padjajaran, untuk dibuat preparat histopatologinya.

4) Pembuatan Preparat

- a) Fiksasi: proses dilakukan setelah mengambil jaringan dan dimasukkan ke dalam gelas piala yang sudah diberikn cairan formalin untuk mencegah proses autolisis.⁵⁷

- b) *Trimming*: setelah jaringan difiksasi maka akan dipotong kecil-kecil sesuai dengan ukuran yang memadai dan akan disimpan difiksatif kontainer.⁵⁷
- c) *Pre-embedding*: jaringan akan dilakukan proses dehidrasi dengan direndam dilarutan alkohol setelah itu kan diinflitrasi oleh parafin.⁵⁷
- d) *Embedding*: jaringan yang sudah diinflitrasi oleh parafin diposisikan didalam cetakan dasar logam yang sudah berisi parafin yang sudah meleleh dan kemudian tempatkan di permukaan yang dingin.⁵⁷
- 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.⁵⁷
- f) *Staining and mounting*: dilakukan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE).⁵⁷
- g) *Storage of paraffin blocks and slide*⁵⁷
- 5) Pengamatan Histopatologi Hepar Tikus

3.2.3.1 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.2.4 Analisis Data

Analisis data gambaran steatosis (makrovesikular dan mikrovesikular) pada organ hepar hewan coba (tikus) merupakan deskriptif.eksploratif.

3.2.5 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.5.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung.

3.2.5.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan September dengan rancangan sebagai berikut.

Tabel 3.3 Rencana Penelitian

No	Kegiatan Penelitian	Waktu Kegiatan (Bulan)							
		Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun-Sep' 19	Jan' 20
1	Penentuan judul penelitian	■							
2	Penyusunan proposal penelitian	■	■						
3	Sidang usulan penelitian			■					
4	Pengumpulan data								■
5	Data <i>cleaning</i>								■
6	Data analysis								■
7	Laporan skripsi								■
8	Sidang Skripsi								■

3.2.6 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 buah, *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 organ hepar sisa organnya akan dikuburkan secara layak.⁵⁸ Penguburan hewan coba biasanya menggunakan metode penggalian lubang atau parit dan memasukan hewan coba kedalam parit selanjutnya ditutup oleh tanah. Hewan coba dibungkus dalam kantong plastik, ditempatkan di dalam sebuah kotak, dan dikubur di bawah tanah. Lubang penguburan harus memiliki jarak dua kaki antara bagian bawah parit dan tinggi permukaan tanah. Pastikan bahwa parit memiliki lubang dan tanggul untuk mengalihkan curah hujan. Parit harus ditutup dengan tanah setinggi dua kaki dan area tersebut harus ditutupi oleh rumput untuk mencegah erosi.^{59,60}

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.⁵⁸

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 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.