

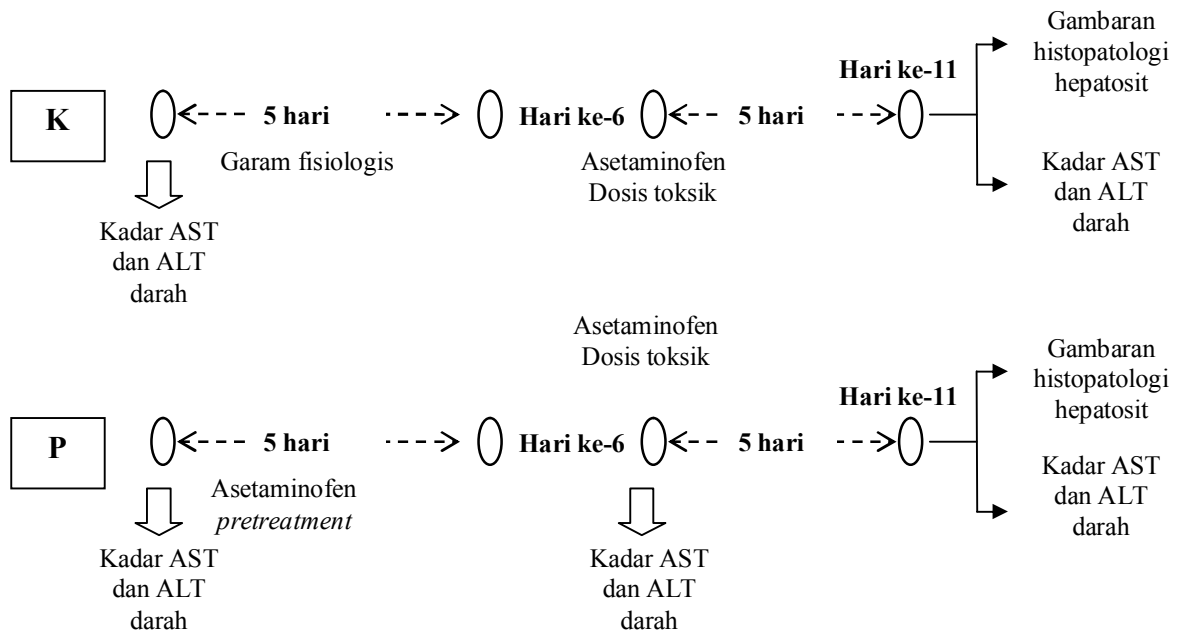
## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain “*Randomized pre and post test control group*”. Kelompok penelitian dibagi menjadi dua, yaitu kelompok Kelompok Kontrol ( K ) dan kelompok perlakuan ( P ). Pembagian kelompok adalah sebagai berikut :

- Kelompok Kontrol ( K ) : Kelompok tikus yang diberi garam fisiologis per oral selama 5 hari. Pada hari ke-6 diberi asetaminofen dosis toksik per oral.
- Kelompok perlakuan ( P ) : Kelompok tikus yang diberi asetaminofen dosis bertingkat *pretreatment* selama 5 hari. Pada hari ke-6 diberi asetaminofen dosis toksik per oral.



#### 4.2. Sampel Penelitian

Hewan coba adalah tikus Wistar yang didapat dari Laboratorium penelitian hewan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam (F-MIPA) Universitas Negeri Semarang..

Kriteria inklusi :

- Tikus Wistar
- Keturunan murni
- Umur empat sampai empat setengah bulan
- Berat badan 250 – 300 gram
- Tidak ada abnormalitas anatomi yang tampak

Kriteria eksklusi :

- Sakit ( gerakan tidak aktif ) selama masa adaptasi 7 hari.
- Mati selama perlakuan berlangsung.

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 6 ekor tiap kelompok.

Randomisasi dilakukan dengan cara pemberian label pada sampel, kemudian tiap label disalin di selembar kertas yang kemudian diambil secara acak.

Enam ekor tikus dikelompokkan secara random menjadi 2 kelompok,yaitu :

Kelompok Kontrol : 6 tikus

Kelompok Perlakuan : 6 tikus.

### **4.3. Variabel Penelitian**

#### **4.3.1 Variabel bebas**

- Status pemberian asetaminofen

Skala : nominal

#### **4.3.2 Variabel tergantung**

- Kadar AST dan ALT 1 hari setelah pemberian asetaminofen *pretreatment* pada kelompok Perlakuan

Skala : Numerik

- Kadar AST dan ALT darah setelah pemberian dosis toksik asetaminofen

Skala : numerik

- Derajat kerusakan sel hepatosit setelah pemberian dosis toksik asetaminofen.

Skala : ordinal

### **4.4. Definisi Operasional**

- Asetaminofen dosis bertingkat *pretreatment* adalah pemberian asetaminofen per oral secara bertahap dimulai dari dosis 50 mg/kgBB dosis tunggal per oral pada hari pertama. Secara bertahap dosis dinaikkan 50 mg/kgBB dosis tunggal per hari sampai dosis mencapai 250 mg/kgBB pada hari ke-5.
- Asetaminofen dosis toksik adalah pemberian asetaminofen dengan dosis 1000 mg/kgBB dosis tunggal per oral pada tikus kelompok Kontrol ( K ) dan kelompok Perlakuan ( P ).

#### **4.5. Waktu Dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 3 bulan. Perlakuan pada tikus dan proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium penelitian hewan jurusan Biologi F-MIPA Universitas Negeri Semarang. Pemeriksaan AST dan ALT darah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi jurusan Biologi F-MIPA Universitas Negeri Semarang. Untuk proses blok parafin sampai pewarnaan dilakukan di Laboratorium Mikro tenik jurusan Biologi F-MIPA Universitas Negeri Semarang. Interpretasi hasil dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi FK Undip Semarang.

#### **4.6. Bahan Dan Alat Penelitian**

##### **4.6.1 Bahan untuk perlakuan**

Hewan coba adalah tikus Wistar umur 4 sampai 4,5 bulan dan berat 250 – 300 gram. Tikus diperoleh dari fakultas Biologi Universitas Negeri Semarang.

Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang di laboratorium penelitian hewan jurusan Biologi F-MIPA Universitas Negeri Semarang dan diberi pakan standar dan minum secukupnya.

Asetaminofen yang digunakan adalah asetaminofen sirup generik produksi PT Sanbe Farma yang mengandung asetaminofen 24 mg/ml larutan sirup.

##### **4.6.2 Alat untuk mengambil organ hepar**

- a. Pisau skalpel
- b. Pinset bedah
- c. Gunting
- d. Duk steril

#### **4.6.3 Alat dan bahan untuk mengirim sampel**

- a. Larutan bufer formalin 10 %.
- b. Botol kaca dengan penutup.

#### **4.6.4 Bahan untuk pemeriksaan histopatologi**

- a. Larutan Bouin
- b. Larutan bufer formalin 10%
- c. Parafin cair
- d. Albumindan Poly-L-Lysine
- e. Hematoksilin Eosin
- f. Larutan xylol
- g. Alkohol 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 96%
- h. Akuades

### **4.7. Pelaksanaan Penelitian**

#### **4.7.1 Cara perlakuan**

Sejumlah 12 ekor tikus Wistar dilakukan adaptasi selama 5 hari di laboratorium dengan kandang tunggal dan diberi pakan standar secukupnya. Sesudah masa adaptasi berakhir, tikus dibagi menjadi 2 kelompok yang masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus yang ditentukan secara acak.

Perlakuan yang diberikan :

- a. Kelompok Kontrol (K) : Kelompok tikus yang diberi garam fisiologis per oral selama 5 hari.

Pada hari ke-6 diberi asetaminofen 1000 mg/kgBB dosis tunggal per oral.

b. Kelompok Perlakuan (P) : Kelompok tikus yang diberi asetaminofen dosis bertingkat *pretreatment* per oral selama 5 hari.

- Hari pertama diberi asetaminofen 50 mg/kgBB dosis tunggal.
- Hari kedua diberi asetaminofen 100 mg/kgBB dosis tunggal.
- Hari ketiga diberi asetaminofen 150 mg/kgBB dosis tunggal.
- Hari keempat diberi asetaminofen 200 mg/kgBB dosis tunggal.
- Hari kelima diberi asetaminofen 250 mg/kgBB dosis tunggal.

Pada hari ke-6 diberi asetaminofen 1000 mg/kgBB dosis tunggal per oral.

Pada hari pertama penelitian, seluruh tikus diambil sampel darahnya guna pemeriksaan AST dan ALT. Sampel darah dimasukkan ke dalam botol berpenutup dan selanjutnya dikirim ke Laboratorium Mikrobiologi jurusan Biologi F-MIPA Universitas Negeri Semarang untuk pemeriksaan AST dan ALT.

Pada hari ke-enam penelitian, tikus kelompok Perlakuan diambil darah lewat vena peri orbita guna pemeriksaan kadar AST dan ALT darah. Kemudian tikus tiap kelompok diberi asetaminofen dosis 1000 mg/kgBB per oral dosis tunggal. Selanjutnya tikus diberi pakan standar sampai enam hari ke depan.

Pada hari ke-enam pasca pemberian asetaminofen dosis 1000 mg/kgBB, seluruh tikus dari semua kelompok perlakuan segera diambil sampel darah. Sampel darah dimasukkan ke dalam botol berpenutup dan selanjutnya dikirim ke Laboratorium Mikrobiologi jurusan Biologi F-MIPA Universitas Negeri Semarang untuk pemeriksaan AST dan ALT. Pemeriksaan kadar AST dan ALT

darah dilakukan dengan spektrometer merk “Thermo Spektronik” model 4001/4 buatan USA tahun 2006.

Kemudian tikus dimatikan dengan cara dislokasi serviks. Organ hepar yang sudah diambil segera dimasukkan ke dalam botol kaca yang berisi larutan bufer formalin 10 % untuk dikirim ke Laboratorium Mikroteknik jurusan Biologi F-MIPA Universitas Negeri Semarang guna diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Hematoksin Eosin . Setiap hepar dibuat menjadi dua preparat yang terdiri dari berbagai sisi potongan, kemudian masing-masing preparat diamati di bawah mikroskop dalam lima lapangan pandang, yaitu pada keempat sudut dan bagian tengah preparat, dengan perbesaran 400 kali. Sasaran yang dibaca adalah derajat perubahan struktur histopatologi sel hepatosit disekitar vena sentralis, dinyatakan dengan kriteria yang dapat dilihat pada tabel. Data pemeriksaan dicatat dalam formulir untuk kemudian dianalisa.

Tabel 3 Kriteria penilaian histopatologi hepatosit

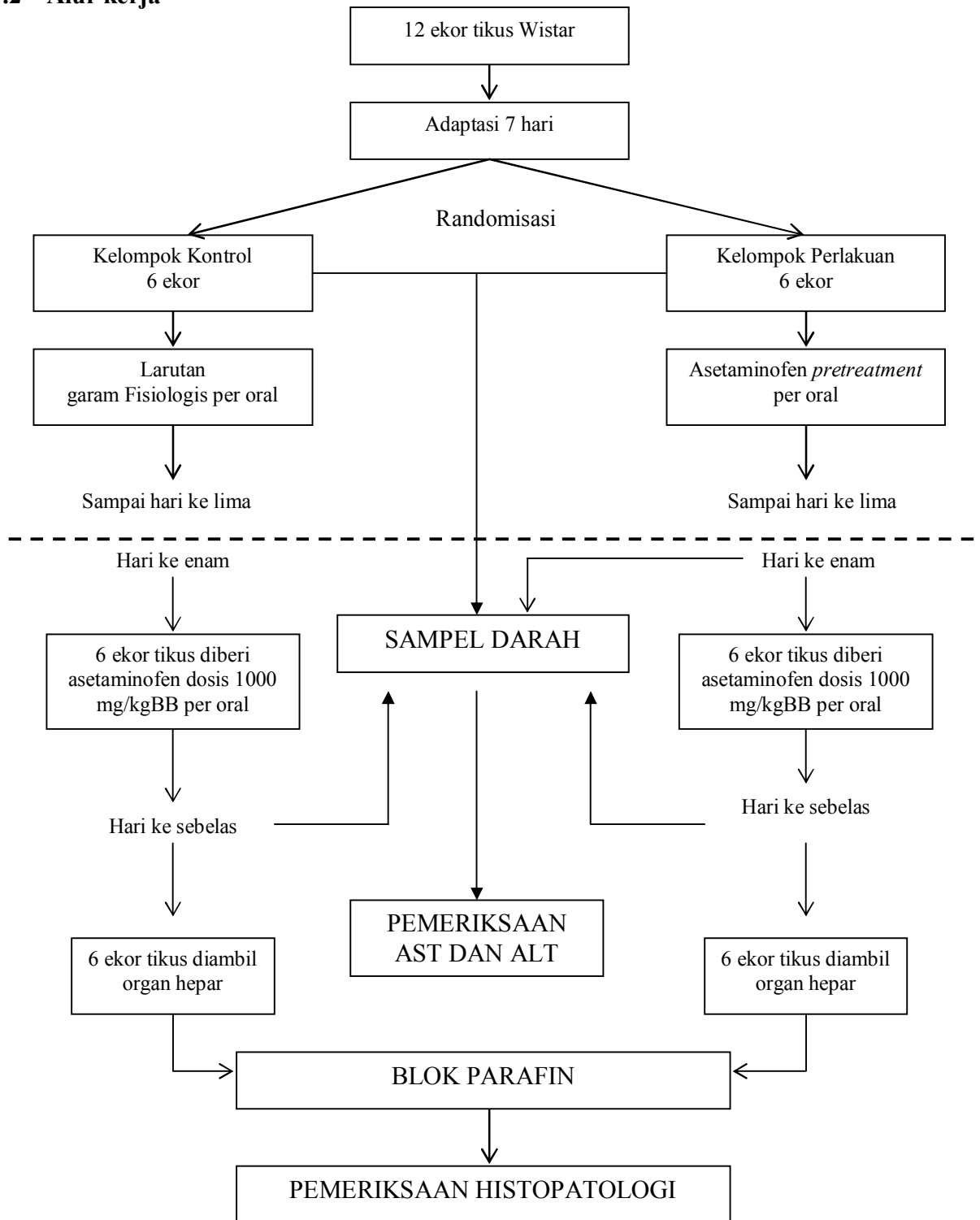
<b>Tingkat perubahan</b>
Normal
Degenerasi albuminosa
Degenerasi hidropik
Nekrosis

Penilaian derajat kerusakan hepatosit berdasarkan kriteria dari Aleksunes M, dkk ( 2002 ) dengan melihat banyaknya jumlah sel yang mengalami nekrosis di zone sentral dengan nilai sbb :<sup>48</sup>

Derajat	0	=	Tanpa nekrosis hepatosit
	1	=	1 – 10% nekrosis hepatosit
	2	=	11 – 25 % nekrosis hepatosit
	3	=	26 – 40 % nekrosis hepatosit

- 4 = 41 – 50 % nekrosis hepatosit
- 5 = > 50 % nekrosis hepatosit

#### 4.7.2 Alur kerja





#### 4.8 Pengolahan dan analisis data

Setelah data terkumpul dilakukan tabulasi data. Data diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program komputer *SPSS 11.5 for windows*.

- Uji normalitas data dengan menggunakan uji Shapiro-Wilks.
- Untuk mengetahui perbedaan kadar AST dan ALT darah pada kelompok Kontrol dan kelompok Perlakuan setelah pemberian dosis toksik asetaminofen memakai uji t tidak berpasangan.

Bila syarat uji parametrik tidak terpenuhi, uji alternatif yang dipakai adalah uji Mann-Whitney.

- Untuk mengetahui perbedaan kadar AST dan ALT darah pada tikus yang diberi asetaminofen dosis bertingkat *pretreatment* sebelum dan sesudah pemberian asetaminofen dosis toksik memakai uji t berpasangan.

Bila syarat uji parametrik tidak terpenuhi, uji alternatif yang dipakai adalah uji Wilcoxon.

- Untuk mengetahui perbedaan kadar AST dan ALT darah pada kelompok Kontrol dan kelompok Perlakuan sebelum dan sesudah pemberian asetaminofen dosis toksik memakai uji t berpasangan.

Bila syarat uji parametrik tidak terpenuhi, uji alternatif yang dipakai adalah uji Wilcoxon.

- Untuk mengetahui perbedaan derajat kerusakan hepatosit pada kelompok Kontrol dan kelompok Perlakuan setelah pemberian dosis toksik asetaminofen memakai uji Kolmogorov-Smirnov.
- Untuk mengetahui hubungan derajat kerusakan hepatosit dengan kadar AST dan ALT darah setelah pemberian asetaminofen dosis toksik memakai uji korelasi Spearman.