

## **BAB IV**

### **METODE PELAKSANAAN**

#### **4.1 Ruang Lingkup Penelitian**

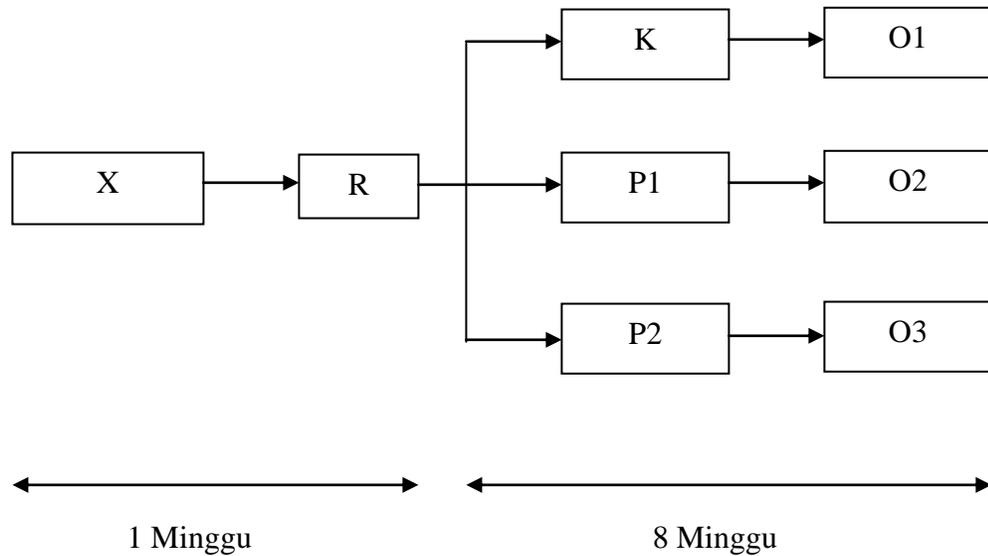
Penelitian ini menyangkut bidang ilmu biokimia, ilmu gizi, dan patologi anatomi

#### **4.2 Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu-Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPTLP3HP) Universitas Gajah Mada Yogyakarta

#### **4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain *randomized post-test control group design*,<sup>40</sup> yang dilakukan dengan rancangan acak lengkap (*completely randomized design*). Tujuan penggunaan desain ini untuk membandingkan 2 kelompok atau lebih dengan cara randomisasi dan mengurangi faktor perancu dalam penelitian.



**Gambar 10.** Skema Rencana Penelitian

Keterangan :

- X            :    Masa adaptasi 1 minggu
- R            :    Randomisasi (3 kelompok)
- K            :    Kelompok kontrol, tikus diberi pakan pellet / standart
- P1           :    Kelompok tikus diberi pakan pellet / standart dan 5% asam lemak trans
- P2           :    Kelompok tikus diberi pakan pellet / standart dan 10 % asam lemak trans
- O 1,2,3     :    Pemeriksaan histopatologi jaringan hati tikus ke tiga kelompok

## **4.4 Populasi dan Sampel**

### **4.4.1 Populasi**

Populasi hewan percobaan yang digunakan adalah Tikus Sprague Dawley jantan dari Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu-Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPTLP3HP) Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

### **4.4.2 Sampel**

Penentuan besar sampel berdasarkan pedoman WHO tentang penggunaan hewan coba untuk eksperimental yaitu minimal 5 di tiap kelompok dengan menambahkan 1 kontrol (WHO, 1993). Oleh sebab itu, minimal sebanyak 6 ekor tikus tiap kelompok. Penelitian ini dilakukan pada 3 kelompok perlakuan dan tiap kelompok terdapat 6 ekor sehingga total berjumlah 18 ekor.

### **4.4.3 Kriteria Sampel**

#### **4.4.3.1 Kriteria inklusi**

- a. Tikus Sprague Dawley jantan
- b. Berat badan tikus normal (190-260 gram)
- c. Umur 7 minggu sebelum dilakukan adaptasi
- d. Pada pengamatan visual tikus tampak sehat, aktif bergerak, dan tidak terdapat kelainan anatomis

#### **4.4.3.2 Kriteria eksklusi**

- a. Tikus tampak sakit selama masa penelitian
- b. Mengalami diare selama masa penelitian

c. Mengalami perubahan berat badan > 10% selama adaptasi

#### **4.5 Variabel Penelitian**

##### **4.5.1 Variabel bebas**

Pemberian asam lemak trans dengan dosis 5% dan 10%

##### **4.5.2 Variabel terikat**

Persebaran sel radang pada hepar dengan menghitung rerata jumlah sel radang dari 5 LPB pada 1 preparat

#### **4.6 Definisi Operasional Variabel**

##### **4.6.1 Asam lemak trans**

Asam lemak trans diberikan dalam bentuk pellet sebanyak 20 gr/hari dengan dosis 5 % dan 10 %

Skala: Rasio

##### **4.6.2 Derajat persebaran sel radang pada hepar**

Merupakan infiltrasi sel-sel inflamasi yang terdiri dari limfosit, eosinofil, dan terkadang polimorfonuklear, pengukuran histopatologi hepatosit dengan pewarnaan HE, dilihat dibawah mikroskop.

Skala: Ordinal

## **4.7 Cara Pengumpulan Data**

### **4.7.1 Alat**

- a. Alat dan sarana pemeliharaan hewan coba
- b. Alat yang digunakan untuk membuat preparat
  - 1) Cetakan parafin
  - 2) Kertas saring
  - 3) *Waterbath*
  - 4) *Microtomy* (pemotong jaringan)
  - 5) *Object glass*
  - 6) *Deck glass*

### **4.7.2 Bahan**

- a. Tikus jantan Sprague Dawley umur 9 minggu dengan berat 150-200 gr  
(memenuhi kriteria inklusi)
- b. Ransum pakan standart untuk hewan coba yang dibuat oleh UPHP UGM
- c. Pakan tikus yang mengandung asam lemak trans dalam bentuk pelet,  
diproduksi oleh diet research Amerika serikat dengan dosis:
  - a) 5 % asam lemak trans dengan kode D11102101
  - b) 10 % asam lemak trans dengan kode D11102102
- d. Pembuatan preparat
  - a) Jaringan hati
  - b) Formalin bufer 10 %
  - c) Akohol 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100%

- d) Albumin cair
- e) Parafin cair
- f) Zat pewarna (Aqua, Alkohol 50%, 70%, 80%, 95%, 100%, Xylol, *Hematoxilyn*, dan *Eosin* (HE), HCl 0,025%, cairan *blueing*)
- g) *EZ-mounth*

### **4.7.3 Jenis Data**

Data yang dikumpulkan merupakan data primer yaitu penghitungan sebaran sel neutrofil dan sel limfosit sebagai tanda adanya inflamasi hati.

### **4.7.4 Cara Kerja**

#### **4.7.4.1 Pemberian pakan asam lemak trans**

- 1) Kelompok 1 diberi pakan berupa pelet yang tidak mengandung asam lemak trans
- 2) Kelompok 2 diberi pakan berupa pelet yang mengandung asam lemak trans sebanyak 5%
- 3) Kelompok 1 diberi pakan berupa pelet yang mengandung asam lemak trans sebanyak 10%

#### **4.7.4.2 Persiapan perawatan hewan coba**

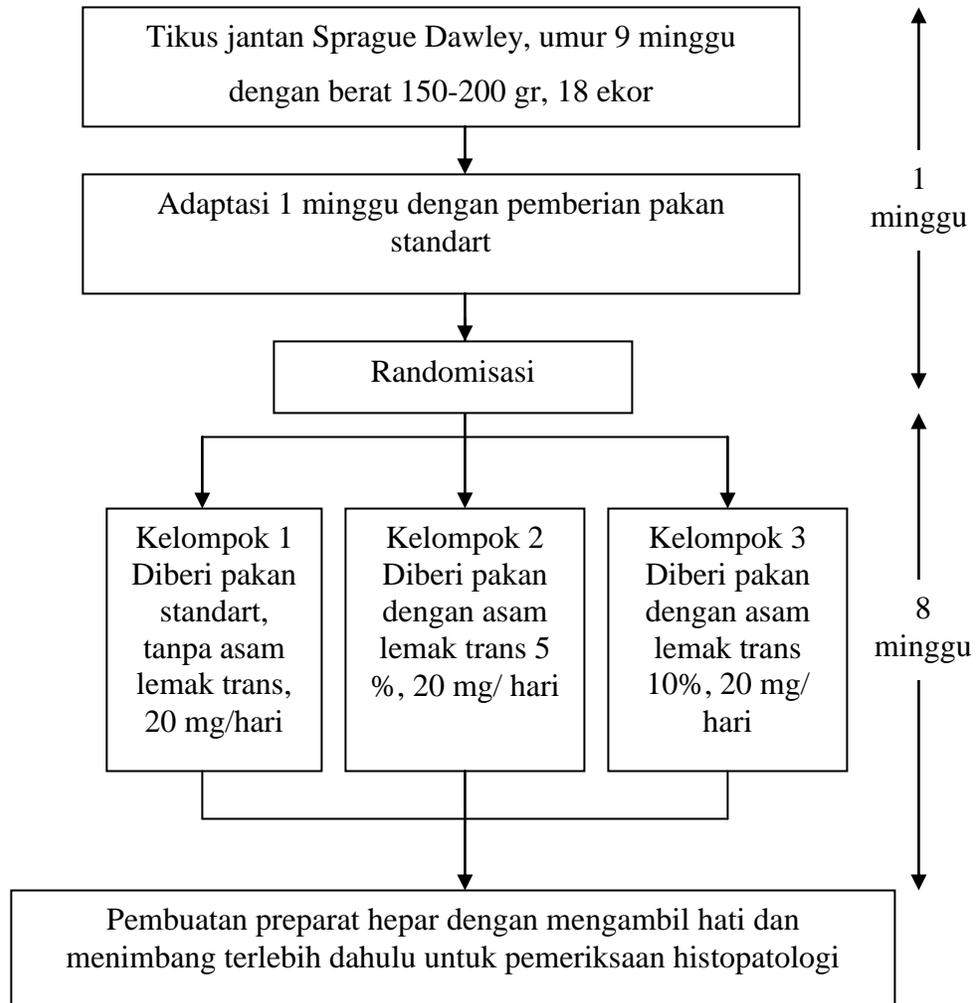
- 1) Tikus Sprague Dawley jantan berumur 9 minggu ditempatkan dalam kandang individual yang memiliki ventilasi baik dan penerangan yang memadai (12:12 jam siklus gelap terang)
- 2) Suhu berkisar 26-32°C dan memiliki kelembaban relatif 50-60%
- 3) Pembersihan kandang setiap hari, pagi dan sore

- 4) Pemberian makanan pelet sesuai kelompok dan minum air secara *ad libitum* setiap hari

#### **4.7.4.3 Pemeriksaan Histopatologi Hepar**

- 1) Persiapan jaringan hepar
- 2) Pemrosesan jaringan yang terdiri dari
  - a. Fiksasi
  - b. Dehidrasi
  - c. Clearing
  - d. Infiltrasi parafin
  - e. Pembuatan blok parafin
  - f. Pemotongan tipis menggunakan *microtomy* agar mendapatkan hasil yang maksimal
  - g. Pengecatan menggunakan *Hematoxylin* dan *Eosin* (HE)
- 3) Pemeriksaan di bawah mikroskop dengan menghitung rerata jumlah sel radang dari 5 lapangan pandang besar

#### 4.8 Alur Penelitian



**Gambar 11.** Alur Penelitian

#### 4.9 Pengolahan dan Analisis Data

Data primer yang diperoleh dianalisis melalui proses:

1. Analisis deskriptif, menampilkan mean, median, standar deviasi, dan diagram *box-plot*
2. Analisis statistik, melakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk* dengan didapatkan nilai  $p$  bermakna ( $p \geq 0,05$ ) sehingga dilanjutkan dengan

uji *one way anova (analysis of variance)*. Demi mendapatkan perbedaan masing-masing kelompok perlakuan, dilakukan analisis data *Post-Hoc* Nilai  $p$  sel radang didapatkan  $p < \alpha$  (0,05).

Analisis data ini akan menggunakan program komputer SPSS 20.0 version for windows.

#### **4.10 Etika Penelitian**

Sebelum penelitian dilakukan, penelitian akan dimintakan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP Dr. Kariadi Semarang.