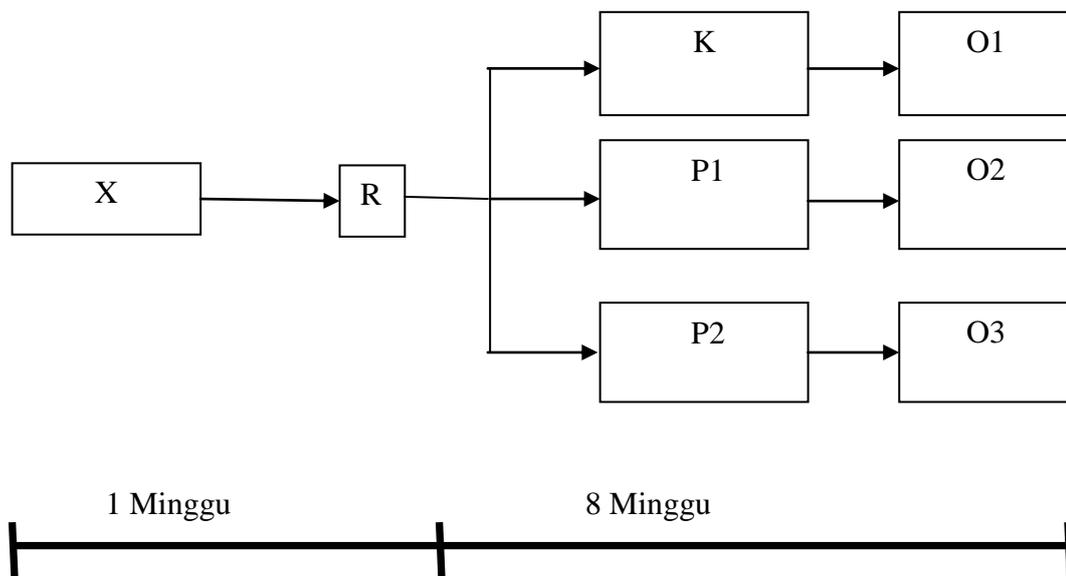


BAB IV

METODA PENELITIAN

IV.1. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik (true experiment designs) dengan rancangan *randomized post-test control group design*,⁵⁶ yang dilakukan dengan rancangan acak lengkap (*completely randomized design*). Tujuan penggunaan disain ini adalah untuk membandingkan dua kelompok atau lebih dengan cara randomisasi dan mengurangi faktor perancu dalam penelitian.



Gambar 9. Rancangan Penelitian

Keterangan :

X = Masa adaptasi 1 minggu

R = Randomisasi (3 Kelompok)

K = Kelompok kontrol, tikus diberi pakan *pellet*/standar

P1 = Kelompok tikus diberi pakan 5 % asam lemak *trans*

P2 = Kelompok tikus diberi pakan 10 % asam lemak *trans*

O_{1,2,3} = Pemeriksaan histopatologi jaringan hati tikus ke tiga kelompok

IV.2. Populasi Dan Sampel

IV.2.1. Populasi

Populasi (hewan percobaan) yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) yang berasal dari Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu-Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPTLP3HP) Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

IV.2.2. Sampel

Penentuan besar sampel ditentukan berdasarkan pedoman WHO tentang penggunaan hewan coba untuk eksperimental. Tiap kelompok perlakuan minimal 5 dengan menambahkan kontrol satu (WHO,1993). Berdasarkan ketentuan tersebut diperoleh besar sampel tiap kelompok perlakuan minimal 6 ekor. Jumlah sampel yang digunakan minimal 18 ekor. Penelitian ini dilakukan pada 3 kelompok perlakuan, tiap kelompok perlakuan terdiri dari 6 ekor, sehingga didapatkan total sampel sejumlah 18 ekor.

IV.2.3. Kriteria Sampel

IV.2.3.1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus jantan
- b. Kondisi sehat, aktif bergerak
- c. Tidak ada kelainan anatomis.
- d. Berat badan tikus normal: 200 - 250 gram pada umur 9 minggu.

IV.3.2.2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus mengalami penurunan berat badan.
- b. Tikus mengalami diare yang ditandai dengan feses tidak berbentuk
- c. Perubahan berat badan selama adaptasi > 10 %
- d. Tikus mati pada saat penelitian berlangsung.

IV.4. Variabel Penelitian

IV.4.1. Klasifikasi Variabel

Variabel Bebas : Pemberian asam lemak *trans* dengan dosis 5 % dan 10 %.

Variabel Terikat : Derajat steatosis , Inflamasi lobular dan *Ballooning* hepatosit.

IV.4.2. Definisi Operasional Variabel

- a. Asam lemak *trans*.

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

Skala rasio.

- b. Derajat steatosis hepatosit

Steatosis hepatosit adalah akumulasi lemak di dalam hepatosit. diukur dengan histopatologi hepatosit pewarnaan HE, dilihat dibawah mikroskop menggunakan NAFLD *activity score* (NAS).

Skala ordinal

- c. Derajat inflamasi lobuler

Inflamasi lobuler adalah infiltrasi sel-sel inflamasi yang terdiri dari limfosit, eosinofil dan terkadang polimorfonuklear, diukur dengan

histopatologi hepatosit pewarnaan HE, dilihat dibawah mikroskop menggunakan NAFLD *activity score* (NAS).

Skala Ordinal

d. Derajat degenerasi *ballooning*

Degenerasi *ballooning* adalah pembengkakan hepatosit yang terjadi akibat kerusakan pada membran biologi sel diukur dengan histopatologi hepatosit pewarnaan HE, dilihat dibawah mikroskop menggunakan NAFLD *activity score* (NAS).

Skala ordinal

IV.5. Alat dan Bahan

IV.5.1. Alat

Alat-alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah :

- a. Alat dan sarana pemeliharaan hewan coba
- b. Alat untuk pembuatan preparat :
 - 1) Kertas saring
 - 2) Cetakan parafin
 - 3) *Microtomy* (alat pemotong jaringan)
 - 4) *Waterbath*
 - 5) Objek Glass dan deglass

IV.5.2. Bahan

- a. Tikus jantan (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) berumur 9 minggu, berat 200 - 250 gr atau memenuhi kriteria inklusi.
- b. Ransum pakan untuk hewan coba yang dibuat oleh UPHP UGM

- c. Asam lemak *trans* yang berasal dari produk *research diet* Amerika dengan dosis 5 % dan 10 % Asam lemak *trans* dibuat dalam bentuk pellet tikus yang diproduksi oleh *diet research* Amerika Serikat sebanyak 20 gr /hari dengan dosis 5 % dan 10 % .
- d. Bahan dan specimen untuk pembuatan preparat
 - 1) Jaringan hati (biopsi)
 - 2) Formalin *bufer* 10 %
 - 3) Alkohol 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, dan 100 %
 - 4) Albumin cair
 - 5) Parafin cair
 - 6) Alat pewarnaan (Aqua, Alkohol 50%, 70%, 80 %, 95 %,100%,
Xylol, *Hematoxilyn* dan *Eosin* (HE), HCl 0,025%, cairan *blueing*,
 - 7) *EZ-mounth*

IV.5.3. Prosedur Penelitian

IV.5.3.1. Persiapan Hewan Percobaan.

Hewan percobaan di pelihara dengan kandang individual, dibersihkan setiap hari. Temperatur suhu 28-32⁰C dan ada sirkulasi udara serta cahaya yang memadai (12 jam siklus gelap / terang) dan dilakukan aklitimasi yang menyesuaikan terhadap iklim dan lingkungan.

Penelitian diawali dengan mempersiapkan tikus jantan (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) usia 9 minggu, sejumlah 18 ekor yang diadaptasi selama 7 hari dengan pemberian pakan standar PAR-G AD II. Berat badan

di timbang, dikelompokkan secara acak menjadi 3 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 6 ekor. Pakan standar untuk kelompok kontrol dan tinggi asam lemak *trans* dengan dosis 5 % dan 10 % untuk kelompok perlakuan diberikan selama 8 minggu. Akhir perlakuan sejumlah 18 ekor tikus diterminasi dengan memperhatikan etikal pada hewan coba sesuai deklarasi Helsinki 1975 dengan teknik eutanasi yang akan digunakan adalah teknik anestesi overdosis dengan menggunakan eter. Awalnya, tikus yang akan dikorbankan dimasukkan kedalam *stoples*, kemudian ditutup rapat, 10-20 ml eter dituang kedalam kapas dan dimasukkan kedalam *stoples* yang telah dihuni oleh tikus tersebut. Dua sampai 5 menit kemudian dilakukan pengamatan terhadap nafas, dan denyut jantung. Apabila tikus sudah tidak bernafas, tutup *stoples* dibuka dan tikus diletakkan di tempat nekropsi. Sebelum dilakukan pembedahan, dilakukan pengamatan kembali terhadap denyut jantung dan nafas untuk memastikan hewan sudah benar-benar mati, diambil organ hati, ditimbang dan dibuat preparat dengan pewarnaan HE untuk melihat gambaran histopatologi hati.

IV.5.3.2. Persiapan Pakan.

Pakan standar menggunakan pakan standar berdasarkan diet untuk rodentia dari PAR-G AD II. Pakan standar adalah makanan bagi semua tikus selama penelitian. Pakan standar diberikan selama 7 hari adaptasi hewan percobaan dan diteruskan untuk kelompok kontrol selama 8 minggu. Pakan tinggi asam lemak *trans* 5 % dan 10 % dalam bentuk *pellet* selama 8 minggu untuk kelompok perlakuan.

IV.6. Analisis Histopatologi hepar

Pemeriksaan histopatologi hepar dimulai dengan persiapan jaringan hepar kemudian dilakukan prosesi jaringan yang terdiri dari, fiksasi, dehidrasi, *clearing*, dan infiltrasi parafin, dibuat blok parafin dan dipotong tipis dengan menggunakan mikrotomi untuk mendapatkan hasil yang maksimal dilanjutkan dengan pengecatan menggunakan *Hematoxylin* dan *eosin* (HE) dan diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x dengan 5 lapang pandang dan 20 hepatosit.

IV.7. Pengolahan dan Analisis Data

Data primer yang diperoleh dikumpulkan, dilakukan proses edit, *coding* dan *entry* ke dalam file computer. Setelah *dicleaning*, data akan dianalisis melalui proses sebagai berikut :

- a. Analisis deskriptif dengan menampilkan nilai rata-rata, median, simpangan baku dan diagram *box-plot* untuk setiap kelompok.
- b. Analisis statistik dengan melakukan uji normalitas distribusi menurut kelompok perlakuan dengan uji *Saphiro Wilk*, distribusi data normal dilanjutkan dengan uji *one way anova*, distribusi data tidak normal dilanjutkan dengan analisis non parametrik dengan uji *Krukal wallis* untuk melihat adanya perbedaan diantara dua kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan uji *Mann Withney* apabila didapatkan adanya perbedaan yang bermakna diantara kelompok intervensi. Nilai p bermakna apabila nilai $p < \alpha (0,05)$

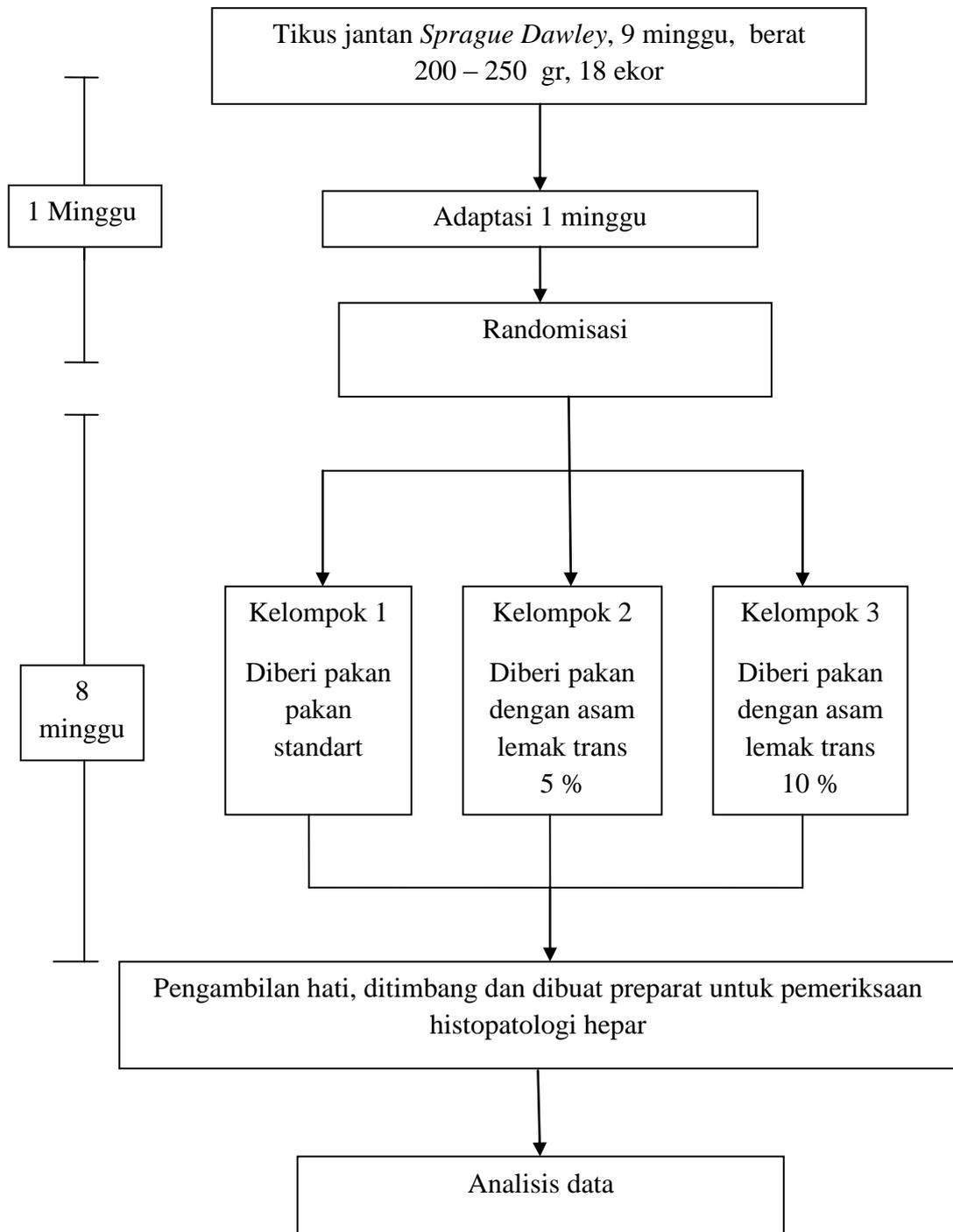
IV.8. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu-Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPTLP3HP) Universitas Gajah Mada Yogyakarta untuk pemeliharaan hewan coba. Pelet pakan hewan coba dibuat oleh *research diet* Amerika Serikat. Pemeriksaan histopatologi hati dikerjakan oleh Laboratorium Patologi Kedokteran hewan UGM dan dibaca oleh ahli patologi di laboratorium Patologi Semarang. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* yang dilaksanakan selama 8 minggu.

IV.9. Ethical Clearance

Pelaksanaan penelitian ini membutuhkan *ethical clearance* yang diperoleh dari komisi Etik Penelitian Kesehatan dan Kedokteran Universitas Diponegoro.

IV.10. Alur Kerja Penelitian



Gambar 10. Alur penelitian