

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang Lingkup Penelitian**

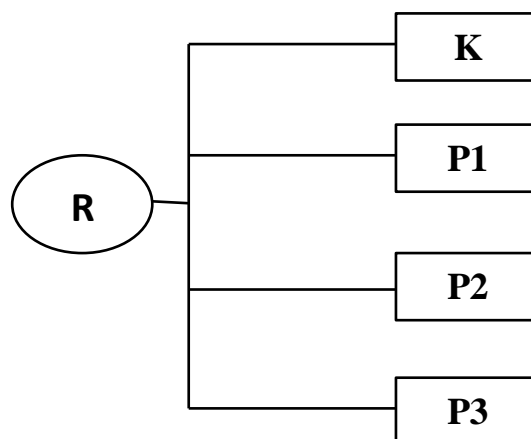
Penelitian ini berkaitan dengan Ilmu Kedokteran Forensik, Ilmu Patologi Anatomi, dan toksikologi.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Pemeliharaan hewan coba dilakukan di *Animal Care* Universitas Negeri Semarang. Pemeriksaan histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / Rumah Sakit Nasional Diponegoro, Semarang. Penelitian ini dilakukan pada April 2017 – Juni 2017.

#### **3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design* yang menggunakan tikus *Wistar* jantan sebagai objek penelitian, dengan 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan dengan randomisasi sederhana.



Keempat kelompok tikus tersebut adalah :

Kontrol (K) : diberi pakan standar

Perlakuan 1 (P1) : diberi *Butylated Hydroxytoluene* 300 mg  
(1/2 LD<sub>50</sub>)

Perlakuan 2 (P2) : diberi *Butylated Hydroxytoluene* 600 mg  
(LD<sub>50</sub>)

Perlakuan 3 (P3) : diberi *Butylated Hydroxytoluene* 1200 mg  
(2x LD<sub>50</sub>)

### **3.4 Populasi dan Sampel**

#### 3.4.1 Populasi Target

Populasi target adalah tikus *Wistar* yang diperoleh dari Animal Care Universitas Negeri Semarang.

#### 3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah tikus *Wistar* yang memenuhi kriteria inklusi dan kriteria eksklusi.

#### 3.4.3 Sampel

##### 3.4.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus *Wistar* jantan
- b. Usia 2-3 bulan
- c. Berat badan 150-250 gram
- d. Dalam keadaan sehat dan tidak ada kelainan anatomi

### 3.4.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tidak bisa makan dan minum secara alamiah
- b. Tikus yang sakit atau mati sebelum penelitian

### 3.4.4 Cara sampling

Pengambilan sampel dilakukan dengan *simple random sampling*. Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel diambil dari tikus *Wistar* yang sudah memenuhi kriteria inklusi sehingga dianggap cukup homogen.

### 3.4.5 Besar Sampel

Sampel penelitian diperoleh dari populasi yang ada secara random. Penentuan besar sampel berdasarkan ketentuan WHO dengan jumlah sampel minimal 5 ekor per kelompok. Pada penelitian ini terdiri dari 4 kelompok perlakuan, sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan 20 ekor tikus.

## **3.5 Variabel Penelitian**

### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian *Butylated Hydroxytoluene* per oral dengan berbagai dosis.

### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologis hepar tikus *Wistar*.



### 3.6 Defenisi Operasional

**Tabel 4.** Definisi Operasional

| No. | Variabel                              | Definisi Operasional                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Cara Pengukuran                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Unit        | Skala   |
|-----|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------|
| 1   | Dosis <i>Butylated Hydroxytoluene</i> | BHT adalah zat antioksidan yang juga digunakan sebagai bahan tambahan makanan berupa serbuk.                                                                                                                                                                                                                                                                            | Pemberian <i>Butylated Hydroxytoluene</i> (BHT) dengan dosis 300, 600, 1200 mg. Penentuan dosis perlakuan berdasarkan dosis LD <sub>50</sub> , yaitu >2930 mg/kgBB, lalu diambil dosis 1/2 LD <sub>50</sub> , LD <sub>50</sub> dan 2x LD <sub>50</sub> , yaitu 300 mg, 600 mg dan 1200 mg. BHT sebelumnya dilarutkan dalam minyak jagung yang disondekan peroral setiap hari dengan jam yang sama selama 14 hari. | mg/Kg<br>BB | Ordinal |
| 2   | Gambaran histopatologi hepar          | Preparat jaringan hepar dibuat menggunakan pengecatan Hematoksilin dan Eosin (HE). Preparat diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Setiap preparat diamati pada 5 lapangan pandang berbeda yang dianggap mewakili gambaran keseluruhan. Pengamatan dilakukan sebanyak 2 kali dan diambil derajat kerusakan tertinggi pada masing-masing preparat. | Penilaian derajat kerusakan histopatologi hepar tikus <i>Wistar</i> mengacu pada sistem skoring Manja Roenigk berdasar sebagai berikut:<br>- 1 : normal<br>- 2:Degenerasi parenkimatososa (ringan)<br>- 3:Degenerasi hidropik (sedang)<br>- 4 : nekrosis (berat)<br>Skor akan dijumlahkan dan dirata-rata untuk 5 lapang pandang.                                                                                 | -           | Numerik |

### 3.7 Cara Pengumpulan Data

#### 3.7.1 Alat dan Bahan

1. Perlakuan
  - a. Tikus *Wistar* sebanyak 20
  - b. Kandang tikus *Wistar*
  - c. Tempat makan dan minum tikus
  - d. Makanan standar untuk tikus
  - e. Alat sonde
  - f. Air minum standar untuk kelompok kontrol
  - g. Serbuk / bubuk *Butylated Hydroxytoluene* untuk kelompok perlakuan
  - h. Minyak jagung
2. Perlakuan euthanasi
  - a. Pisau skalpel
  - b. Pinset bedah (chirurgis)
  - c. Gunting operasi lurus tajam / tumpul
  - d. Botol plastik tertutup dan berlabel berisi buffer formalin 10% dengan volume 10 kali dari sampel organ yang dimasukkan.
3. Pembuatan slide sediaan histopatologi dan interpretasinya
  - a. Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan, yaitu larutan Bouin, larutan buffer formalin 10%, parafin, albumin, hemotoksilin eosin, larutan xylol, alkohol 30%, alkohol 40%, alkohol 50%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 96%, dan aquades.

- b. Mikroskop cahaya dengan perbesaran hingga 400 kali
- c. Kamera digital untuk dokumentasi

### 3.7.2 Jenis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer yang diperoleh dari gambaran histopatologi hepar tikus *Wistar*, dan dinilai berdasarkan kerusakan hepar tikus *Wistar* dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol

### 3.7.3 Cara Kerja

Sampel berjumlah 20 ekor tikus, dibuat menjadi 4 kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus yang dibagi secara acak. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol yang diberi pakan standar dan minyak jagung. Sedangkan kelompok lainnya merupakan kelompok perlakuan yang mendapat *Butylated Hydroxytoluene* dengan dosis bertingkat yang dilarutkan dalam minyak jagung.

Tikus diadaptasikan selama 1 minggu sebelum diberi perlakuan dengan dikandangkan per kelompok dan diberi pakan standar dan minum yang sama selama 1 minggu secara *ad libitum*. Setelah itu masing-masing kelompok tikus mendapat perlakuan berbeda selama 14 hari.

Tikus diperlakukan seperti di atas, dimana *Butylated Hidroxytoluene* yang sudah dilarutkan dalam minyak jagung diberikan secara sonde selama 14 hari oleh tenaga ahli setiap pagi pada jam yang sama. Setelah diberi perlakuan, tikus yang belum mati dalam 14 hari dimatikan dengan cara inhalasi dimana sebelumnya tikus sudah di anastesi terlebih dahulu. Selanjutnya heparnya diambil, difiksasi dengan buffer formalin, kemudian dibuat preparat menggunakan metode

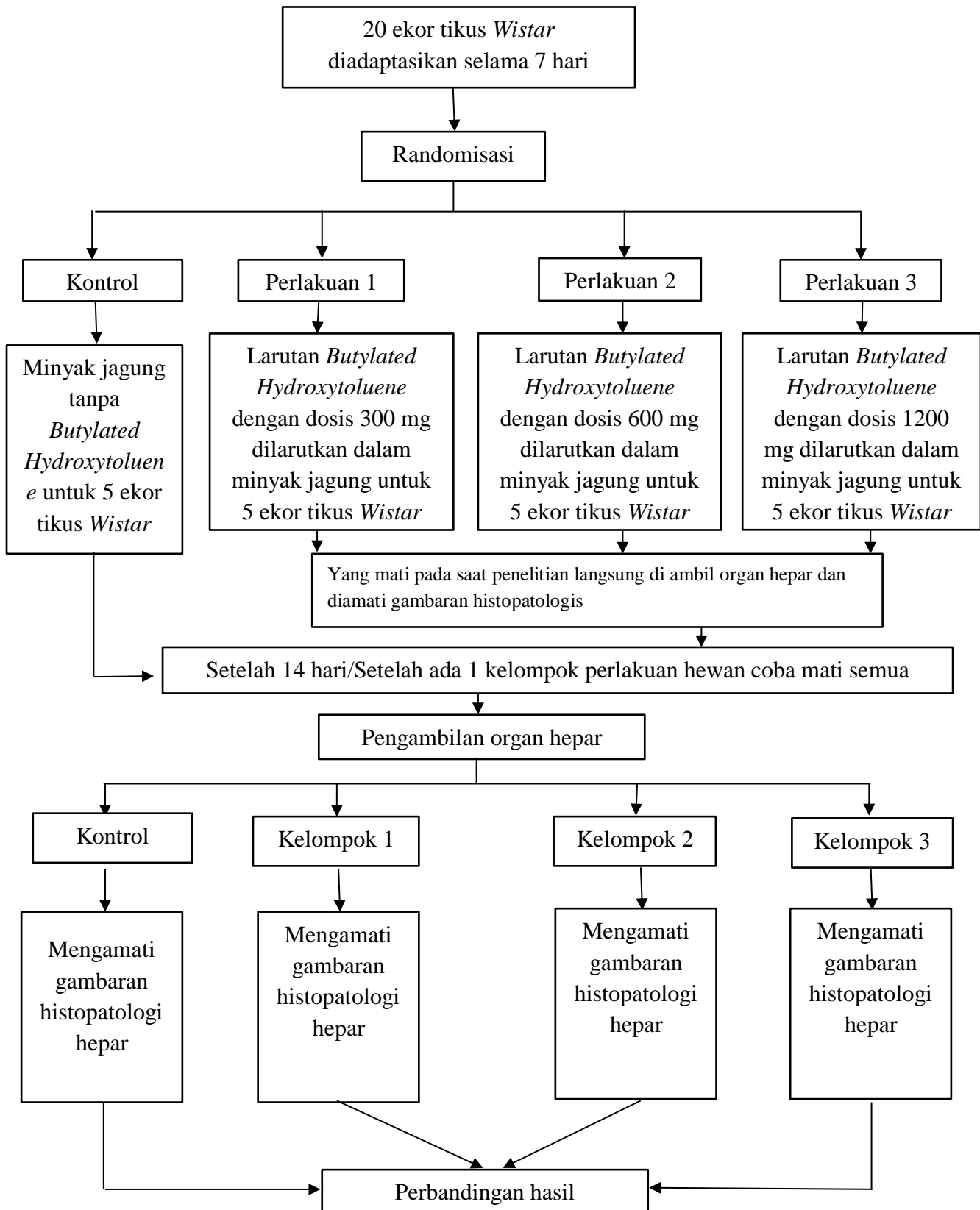
baku histologi pemeriksaan jaringan. Setelah itu dilakukan pemeriksaan mikroskopis terhadap jaringan hepar tersebut. Dari setiap tikus dibuat 5 preparat hepar dan tiap preparat diamati pada 5 lapangan pandang yaitu pada keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan perbesaran 100x dan 400x. Lalu pada setiap preparat dihitung nilai rerata degenerasi-nya dengan cara mengalikan jumlah sel sesuai kategori-nya dengan nilai yang ada pada tabel. Kelainan dilihat berdasarkan persentase jumlah sel yang ada di lapang pandang baik dari kelainan yang tampak ataupun kelainan yang terbanyak pada lapangan pandang tersebut. Sasaran yang dibaca adalah perubahan struktur histologis hepar tikus. Untuk mengukur perubahan mikroskopis sel hepar, maka digunakan system skoring yang mengacu pada system skoring Manja Roenigk sebagai berikut :<sup>29</sup>

| Degenerasi                          | Grade | Nekrosis                         | Grade |
|-------------------------------------|-------|----------------------------------|-------|
| Tidak terjadi perubahan degeneratif | 0     | Tidak terjadi perubahan nekrotik | 0     |
| <25%                                | 1     | <25%                             | 1     |
| 25%-50%                             | 2     | 25%-50%                          | 2     |
| 50%-75%                             | 3     | 50%-75%                          | 3     |
| >75%                                | 4     | >75%                             | 4     |

**Tabel 5.** Kriteria Penilaian Terhadap sel yang berdegenerasi



### 3.8 Alur Penelitian



### 3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer dan dilakukan uji normalitas untuk mengetahui persebaran datanya normal menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Ternyata distribusi datanya tidak normal, atau varians data tidak sama, maka data ditransformasi. Setelah ditransformasi tetap didapatkan distribusi data yang tidak normal atau tidak sama, maka dilakukan uji beda menggunakan statistik non parametrik yaitu *Kruskal-Wallis*, jika didapat  $p \leq 0,05$  dilanjutkan dengan uji *Post Hoc (Mann Whitney test)*.

### 3.10 Etika Penelitian

*Ethical Clearence* No. 40/EC/H/FK-RSDK/VI/2017 dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro telah diajukan sebelum penelitian dilakukan. Tikus *Wistar* dipelihara di *Animal Care* Universitas Negeri Semarang. Hewan diberi makan dan minum *ad libitum*. Untuk perlakuan, BHT dicampur dengan akuades diberikan dengan menggunakan sonde. Hewan yang belum mati pada hari ke-14 diterminasi dengan cara inhalasi dengan sebelumnya dilakukan anastesi terlebih dahulu. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku mikroskopis pemeriksaan jaringan. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti.



