

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Ruang Lingkup Penelitian

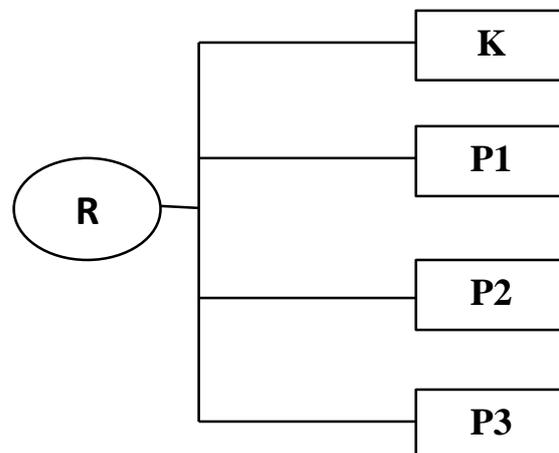
Penelitian ini berkaitan dengan Ilmu Kedokteran Forensik, Ilmu Patologi Anatomi, dan toksikologi.

#### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dilakukan di *Animal Care* Universitas Negeri Semarang. Pemeriksaan histopatologi dilakukan di Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian ini dilakukan pada Mei 2017 – Agustus 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 minyak jagung sebagai pakan standar
- Perlakuan 1 (P1) : diberi *Butylated Hydroxytoluene* 300 mg
- Perlakuan 2 (P2) : diberi *Butylated Hydroxytoluene* 600 mg
- Perlakuan 3 (P3) : diberi *Butylated Hydroxytoluene* 1200 mg

### **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 mengalami sakit atau mati sebelum diberi perlakuan

### **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 dan pada setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 tikus, 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* secara per oral dengan dosis bertingkat.

### **3.5.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi paru tikus *Wistar*.

### 3.6 Definisi Operasional

**Tabel 3.** Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Unit	Skala
1	<i>Butylated Hydroxytoluene</i> per oral berbagai dosis	BHT adalah zat antioksidan yang juga digunakan sebagai bahan tambahan makanan. BHT yang digunakan pada penelitian ini adalah BHT murni berupa bubuk BHT.	BHT yang diberikan kepada hewan coba secara per oral	-	Nominal
2	Dosis <i>Butylated Hydroxytoluene</i>	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 dilarutkan dalam minyak jagung yang disondekan. Setiap hari dengan jam yang sama selama 14 hari.	Ketetapan LD <sub>50</sub> sebanyak 600 mg yaitu dari perhitungan LD <sub>50</sub> BHT, yaitu >2930 mg/kgBB yang dibagi menurut berat badan tikus yaitu 200 gram. Sehingga didapatkan LD <sub>50</sub> dalam percobaan ini ialah 600 mg. Untuk dosis 300 mg/hari dalam 14 hari membutuhkan BHT sebanyak 4200 mg. Untuk dosis 600 mg/hari dalam 14 hari membutuhkan BHT sebanyak 8400 mg. Untuk dosis 1200 mg/hari dalam 14 hari membutuhkan BHT sebanyak 16800 mg. Jadi total BHT yang digunakan selama penelitian adalah 4200 + 8400 + 16800 = 29400 mg = 294 gram.	mg/Kg BB	Nominal

3	Gambaran histopatologi paru tikus Wistar berupa edema, destruksi septum, infiltrasi radang	Gambaran histopatologi paru tikus <i>Wistar</i> dibawah mikroskop setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE). Pengamatan dilakukan terhadap sel limfosit pada 5 lapangan pandang untuk tiap preparat, kemudian dilakukan skoring pada setiap lapangan pandang, dan diambil skor rerata dari 5 lapangan pandang untuk menentukan derajat infiltrasi sel radang, edema paru dan destruksi dinding alveoli menggunakan kriteria <i>Hansel dan Barnes</i>	- Normal (0%) : 1 - Ringan (> 0% - < 30%) : 2 - Sedang (> 30% - ≤ 60%) : 3 - Berat (> 60%) : 4	Interval	Nominal

### 3.7 Cara Pengumpulan Data

#### 3.7.1 Alat dan Bahan

1. Perlakuan
  - a. Tikus *Wistar* jantan sebanyak 20 ekor
  - b. Kandang tikus *Wistar*
  - c. Tempat makan dan minum tikus
  - d. Makanan standar untuk tikus
  - e. Alat sonde
  - f. Minyak jagung untuk kelompok kontrol
  - g. Serbuk / bubuk *Butylated Hydroxytoluene* yang sudah dilarutkan dalam minyak jagung untuk kelompok perlakuan
2. Perlakuan terminasi
  - 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 100 dan 400 kali

c. Kamera digital untuk dokumentasi

### 3.7.2 Jenis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer yang diperoleh dari paru-paru tikus *Wistar*, dimana dilakukan pengamatan gambaran histopatologi dan dinilai berdasarkan kerusakan paru 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 hanya diberi pakan standar. Sedangkan kelompok lainnya merupakan kelompok perlakuan yang mendapat *Butylated Hydroxytoluene* dengan dosis bertingkat.

Tikus diadaptasikan selama 7 hari sebelum diberi perlakuan dengan dikandangkan per kelompok dan diberi pakan standar berupa minyak jagung selama 7 hari secara *ad libitum*. Setelah itu masing-masing kelompok tikus mendapat perlakuan berbeda selama 14 hari.

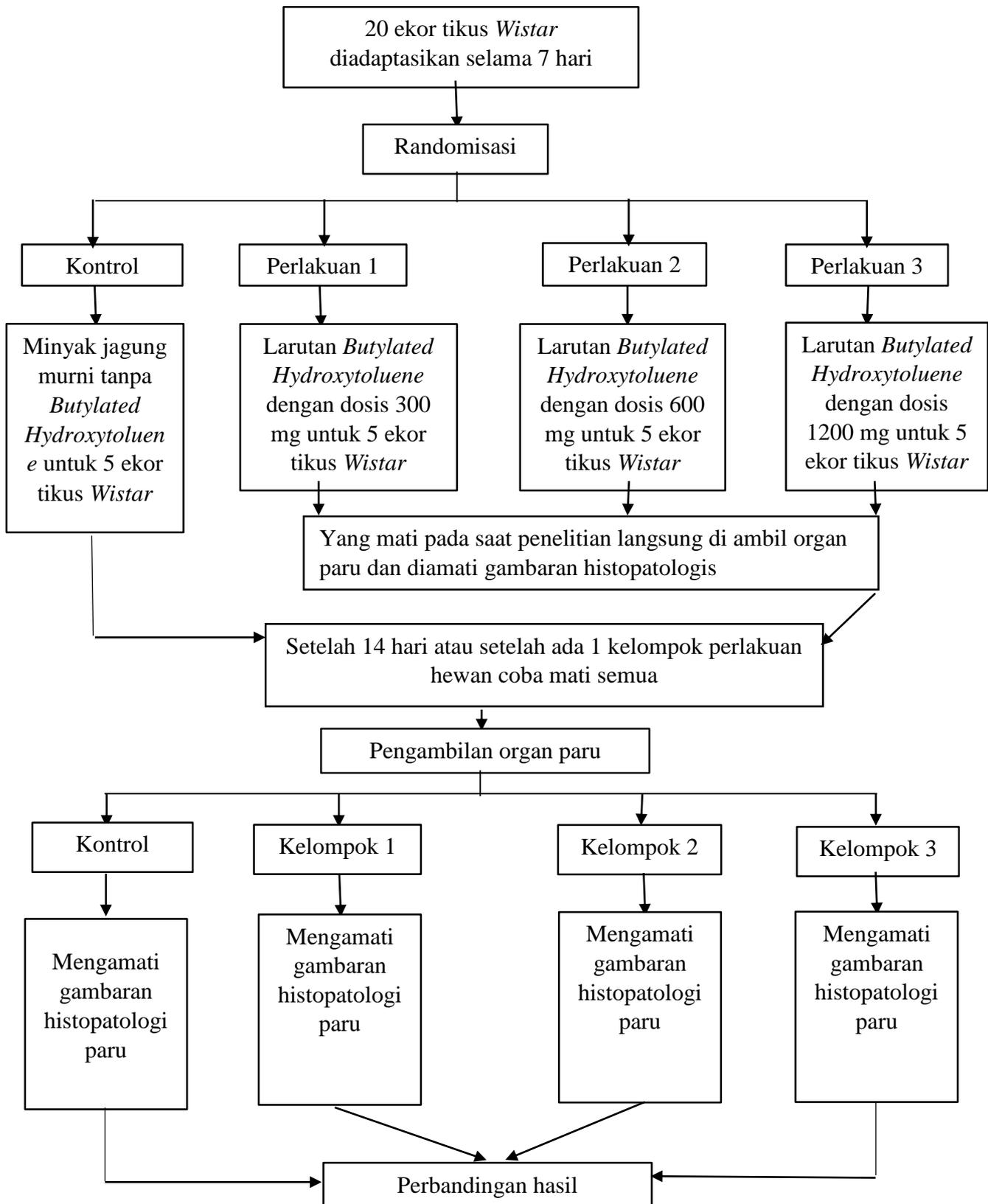
Tikus diperlakukan seperti di atas, dimana *Butylated Hidroxytoluene* diberikan secara sonde selama 14 hari oleh tenaga ahli setiap pagi pada jam yang sama. Setelah diberi perlakuan, tikus yang belum mati dalam 14 hari dimatikan dengan metode inhalasi overdosis kloroform. Selanjutnya parunya diambil, difiksasi dengan buffer formalin, kemudian dibuat preparat menggunakan metode baku histologi pemeriksaan jaringan. Setelah itu dilakukan pemeriksaan mikroskopis terhadap jaringan paru tersebut. Dari setiap kelompok perlakuan

dibuat 5 preparat paru 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 dilihat jenis kerusakan pada paru dan dikelompokkan dengan sistem skoring berdasarkan gambaran destruksi septum alveolar dan infiltrasi limfosit menurut kriteria *Hansel* dan *Barnes* dengan rincian sebagai berikut :

- 1 : Normal (tidak ada kerusakan)
- 2 : Ringan (terdapat kerusakan  $> 0\%$  -  $< 30\%$ )
- 3 : Sedang (terdapat kerusakan  $> 30\%$  -  $\leq 60\%$ )
- 4 : Berat (terdapat kerusakan  $> 60\%$ )

### 3.8 Alur Penelitian

**Tabel 4.** Alur Penelitian



### 3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer dan akan diuji normalitas untuk mengetahui apakah persebaran datanya normal menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Apabila didapatkan distribusi datanya normal dengan variasi data homogen, maka dilanjutkan analisis data untuk menguji perbedaannya dengan menggunakan uji nonparametrik dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, jika nilai  $p < 0,05$  dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

### 3.10 Etika Penelitian

*Ethical Clearence* 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 minyak jagung diberikan dengan menggunakan sonde. Hewan yang belum mati pada hari ke-14 diterminasi dengan metode inhalasi overdosis kloroform. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku mikroskopis pemeriksaan jaringan. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti.

