

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang Lingkup**

Ruang lingkup pada penelitian ini mencakup bidang ilmu Histologi dan Patologi Anatomi.

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

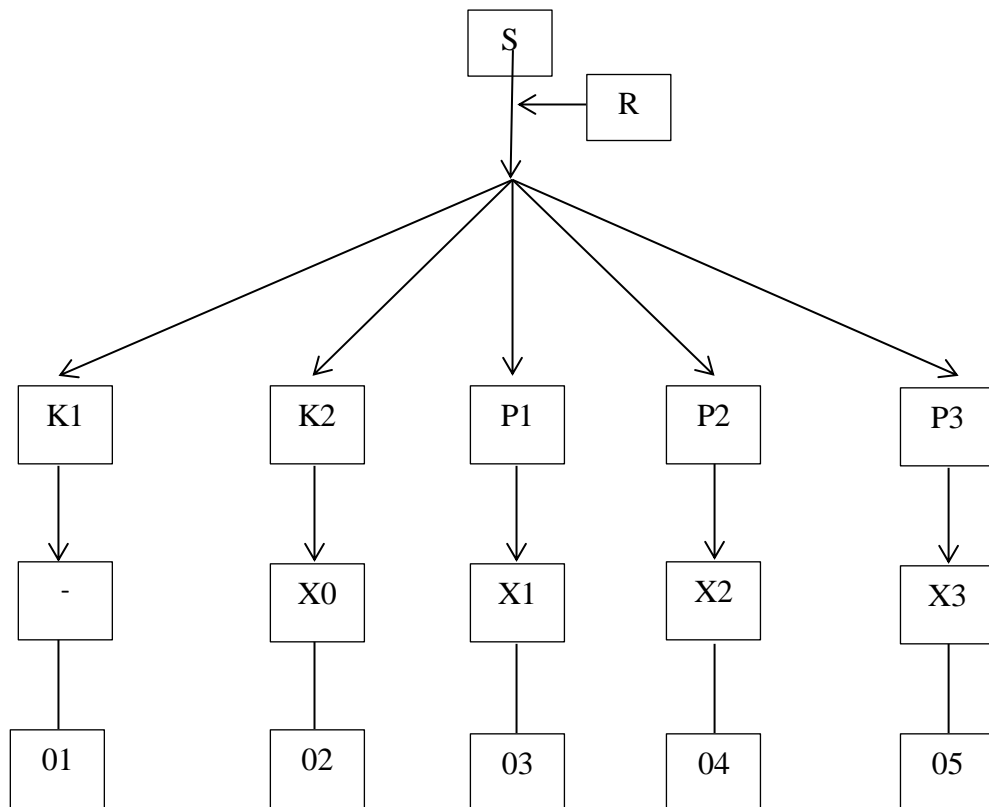
Penelitian, pengumpulan dan analisa data dilakukan pada bulan Maret - September 2018.

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk tempat pemeliharaan serta perlakuan hewan coba. Laboratorium Sentral Rumah Sakit Nasional Diponegoro untuk pembuatan preparat histopatologi aorta hewan coba. Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit dr. Karyadi (RSUP dr. Karyadi), untuk melakukan interpretasi hasil pengukuran diameter lumen aorta hewan coba.

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

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan tikus Wistar sebagai hewan coba.

### Skema rancangan penelitian



Keterangan :

P = Populasi.

S = Kelompok Sampel.

R = Randomisasi.

X0 = Tikus Wistar diberi minyak dengan 1 kali penggorengan

X1 = Tikus Wistar diberi minyak jelantah oral frekuensi 3 kali  
penggorengan dosis 1,5 ml/hari

X2 = Tikus Wistar diberi minyak jelantah oral frekuensi 6 kali  
penggorengan dosis 1,5 ml/hari

X3 = Tikus Wistar diberi minyak jelantah oral frekuensi 9 kali  
penggorengan dosis 1,5 ml/hari

- = Tanpa diberi perlakuan apapun

K 1 = (-)

K 2 = X0 selama 30 hari

P1 = X1 selama 30 hari

P2 = X2 selama 30 hari

P3 = X3 selama 30

O1 = Observasi gambaran mikroskopis aorta X0

O2 = Observasi gambaran mikroskopis aorta X1

O3 = Observasi gambaran mikroskopis aorta X2

O4 = Observasi gambaran mikroskopis aorta X3

O5 = Observasi gambaran mikroskopis aorta X4

### **3.4 Populasi dan Sampel**

#### 3.4.1 Populasi Target

Populasi target pada penelitian ini adalah tikus Wistar.

#### 3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah tikus Wistar yang diperoleh dari UD. Tiput Abadi Jaya Peternakan Hewan Uji, Yogyakarta.

#### 3.4.3 Sampel

##### 3.4.3.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus Wistar Jantan
2. Berat badan rata-rata 150-250 gram

3. Umur 2-3 bulan
4. Tikus dalam keadaan sehat dan aktif bergerak
5. Tidak terdapat kelainan anatomi

#### 3.4.3.2 Kriteria *Drop out*

Mati saat penelitian berlangsung

#### 3.4.4 Cara Pengambilan Sampel

Sampling pada penelitian ini dilakukan *random allocation sampling* untuk menghindari bias karena variasi faktor umur dan berat badan. Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel yang diambil dari tikus Wistar sudah memenuhi kriteria inklusi sehingga dianggap cukup homogen. Semuanya diambil secara acak dari kelompok tikus yang sudah diadaptasi pakan selama 1 minggu.

#### 3.4.5 Besar sampel

Besar sampel mengacu pada pedoman (*World Health Organization*) WHO mengenai penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental. Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan minimal 5 ekor.<sup>28</sup> Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 30 ekor tikus strain Wistar jantan karena terdapat 5 kelompok, tiap kelompok masing masing berjumlah 5 ekor dan ditambah 1 ekor di masing-masing kelompok sebagai cadangan.

### **3.5 Variabel penelitian**

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian minyak jelantah dengan frekuensi penggorengan berbeda yang diberikan secara per oral.

### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah

1. Diameter lumen aorta tikus Wistar.
2. Gambaran histopatologi lumen aorta berdasarkan skoring *American Heart Association (AHA)*

## 3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Definisi Operasional Variabel

Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
Pemberian minyak jelantah	Minyak jelantah pembuatan dengan teknik deep frying pada suhu 190°C. Frekuensi penggorengan minyak jelantah yang digunakan adalah frekuensi bertingkat yang diberikan pada kelompok hewan coba perlakuan 1 (P1) 1,5 ml/ hari minyak jelantah per oral dengan 3 kali penggorengan, perlakuan 2 (P2) 1,5 ml/hari minyak jelantah per oral dengan 6 kali penggorengan, perlakuan 3 (P3) 1,5 ml/hari minyak jelantah per oral dengan 9 kali penggorengan dengan sonde sebanyak satu kali sehari selama 30 hari.	Ordinal
Diameter lumen aorta tikus Wistar	Diameter ( $\mu\text{m}$ ) lumen aorta tikus Wistar baru dapat diukur setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada lima lapangan pandang.	Numerik

---

Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
Gambaran histopatologi lumen aorta	1) Tipe I= Sel busa terbatas pada tunika intima; 2) Tipe II = <i>Fatty Streak</i> ; 3) Tipe III = lemak intraseluler tanpa inti yang terdefinisikan; 4) Tipe IV = inti yang terdefinisikan dengan permukaan luminal yang tertutup tunika intima yang normal (atheroma atau fibroplak); 5) Tipe V = fibroatheroma; 6) Tipe VI = Fibroatheroma dengan defek berupa <i>hemorrhage</i> atau trombosis; 7) Tipe VII = <i>Fibrous Tissue Change Prominent</i> <sup>30</sup>	Nominal 0= tidak ada kerusakan 1 = ada gambaran histopatologi

---

### 3.7 Cara pengumpulan data

#### 3.7.1 Bahan penelitian

- 1) Pembuatan minyak jelantah
  1. Minyak kemasan 3 liter
  2. 9 potong ayam broiler tanpa kulit 100 gram
- 2) Perawatan dan perlakuan hewan coba
  1. 30 ekor tikus Wistar jantan
  2. Pakan dan minum standar secara *ad libitum*
  3. Minyak jelantah 1,5 ml/hari<sup>31</sup>
- 3) Pembuatan preparat histologi
  1. Larutan buffer formalin 10%
  2. Hematoksin eosin
  3. Larutan xylol

4. Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,  
96%

5. Larutan aquades

### 3.7.2 Alat penelitian

#### 3.7.2.1 pembuatan minyak jelantah

1. Wajan penggorengan
2. Termometer 200° C
3. Botol kaca

#### 3.7.2.2 perawatan dan perlakuan hewan coba

1. Kandang hewan coba
2. Timbangan hewan coba
3. Sonde lambung *Syringe*
4. Tabung penampung

#### 3.7.2.3 alat pembuatan preparat histologi

1. Deck glass
2. Objek glass
3. Mikrotom
4. Oven
5. Cetakan parafin
6. Mikroskop cahaya
7. Alat bedah minor (untuk mengambil aorta tikus)
8. Kamera

### 3.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer hasil pengukuran diameter dan penilaian gambaran histopatologi lumen aorta tikus Wistar dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol.

#### 3.7.4 Cara kerja

##### 3.7.4.1 Cara Pembuatan Minyak Jelantah

Minyak kemasan baru sebanyak 2 liter, dibeli di supermarket. Minyak kemasan baru dipanaskan dengan suhu 190° C dalam wajan dengan lebar 45 cm dan kedalaman 20 cm, dan masukkan 100 gram ayam potong tanpa kulit untuk digoreng selama  $\pm 4$  menit.<sup>31</sup> 100 gram ayam potong dimasukkan ke dalam minyak pada setiap kali penggorengan.

##### 3.7.4.2 Perlakuan pada Hewan Coba

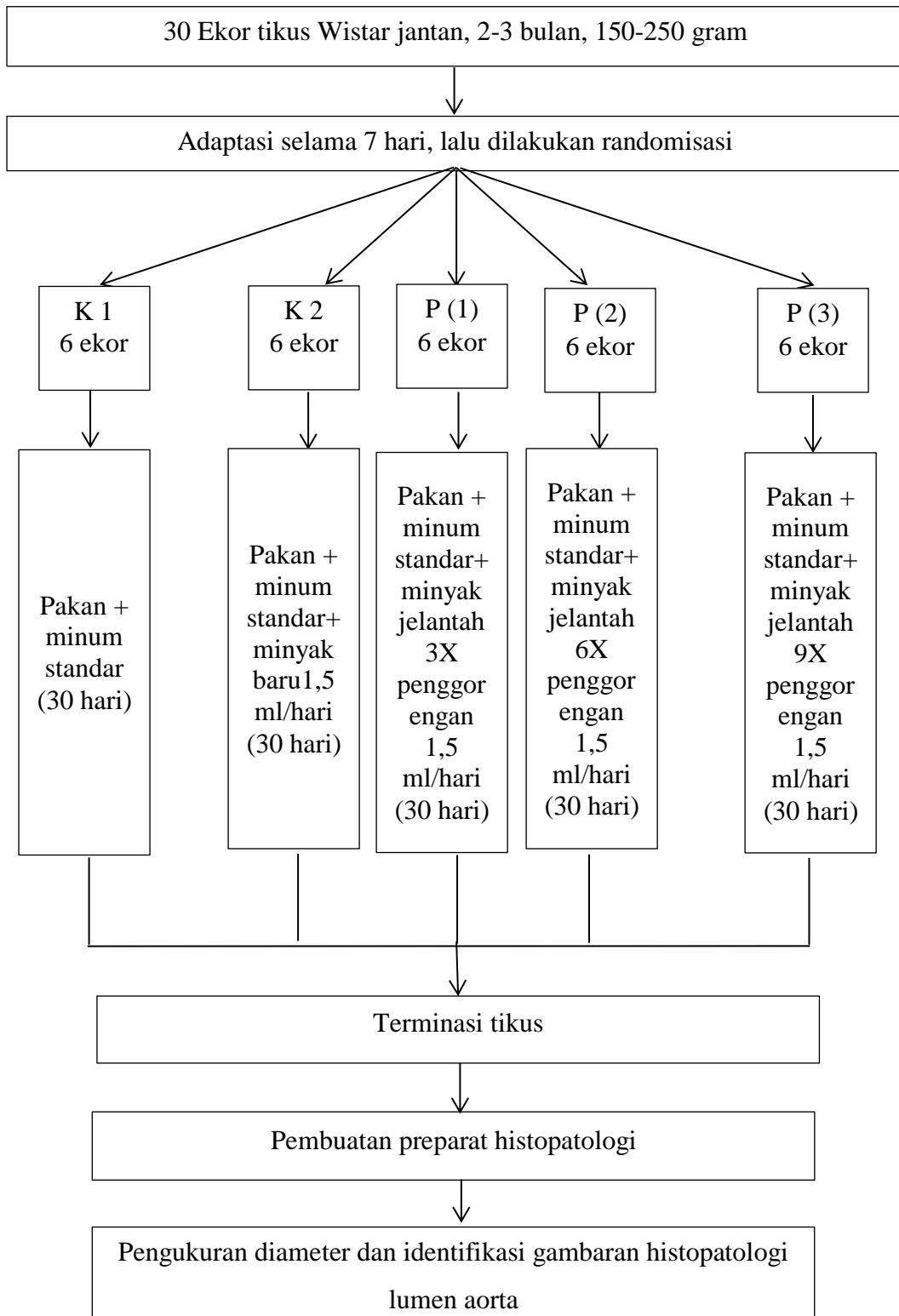
1. 30 ekor tikus Wistar yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang tunggal dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*.
2. Pada hari ke-8, tikus Wistar dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus Wistar yang dipilih berdasarkan *random allocation sampling*.
3. Menimbang berat badan masing-masing tikus Wistar.
4. Mulai hari ke-8 pada kelompok pertama yaitu kelompok kontrol pertama, diberikan pakan standar dan aquadest tanpa perlakuan apapun.



5. Pada kelompok kedua yaitu kelompok kontrol kedua, tikus Wistar diberikan pakan standar, aquadest, dan minyak kemasan baru peroral 1,5 ml/hari selama 30 hari.
6. Kelompok Perlakuan 1, diberikan pakan standar dan minyak jelantah dengan 3 kali penggorengan peroral 1,5 ml/hari selama 30 hari.
7. Kelompok Perlakuan 2, diberikan pakan standar dan minyak jelantah dengan 6 kali penggorengan peroral 1,5 ml/hari selama 30 hari.
8. Kelompok Perlakuan 3, diberikan pakan standar dan minyak jelantah dengan 9 kali penggorengan peroral 1,5 ml/hari selama 30 hari.
9. Tikus Wistar di lakukan anestesi terlebih dahulu lalu dimatikan dengan cara dislokasi leher.
10. Mengambil arkus aorta, sampel arkus aorta tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet buffer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian aorta dan 9 bagian buffer formalin 10%.
11. Tabung berisi sampel arkus aorta tikus Wistar diletakkan ke rak tabung kemudian diserahkan ke analis guna mengolahnya mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE). Dari setiap sampel arkus aorta dibuat preparat dengan

potongan longitudinal dan akan dibaca dalam lima lapangan pandang yaitu dari keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan pembesaran 400x. Sasaran yang diukur adalah diameter dan gambaran histopatologi lumen arkus aorta tikus Wistar.

### 3.8 Alur Penelitian



Gambar 6. Alur penelitian

### **3.9 Analisis data**

Data yang diperoleh diberi kode, ditabulasi dan dimasukkan kedalam kompuuter. Data tersebut dilakukan uji normalitas menggunakan *Saphiro Wilk* dikarenakan jumlah sampel  $< 50$ . Data yang diperoleh terdistribusi normal, lalu dilakukan uji analisis statistik menggunakan *One Way Anova*, dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Benferroni*.

Setelah dilakukan pembacaan ulang preparat histopatologi, didapatkan bahwa 25 preparat lumen pembuluh darah aorta, belum didapatkan gambaran histopatologi yang masuk dalam kriteria aterosklerosis berdasarkan AHA. Maka diambil kesimpulan, tidak terdapat perbedaan antar masing-masing kelompok perlakuan.

### **3.10 Ethical clearance**

Penelitian ini telah mendapatkan izin dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran UNDIP/RSUP Dr. Karyadi No. 16/EC/H/FK-RSDK/IV/2018 pada tanggal 12 April 2018. Biaya penelitian ini sepenuhnya ditanggung oleh peneliti.