

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan oleh peneliti adalah kuasi eksperimental dengan *post-test only control group design*. Penelitian ini menggunakan sampel hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar sebanyak 32 ekor yang dikelompokkan menjadi 8 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 hewan coba, secara acak.

#### **B. Subyek Penelitian**

Subyek penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

##### **1. Jumlah Sampel**

Estimasi jumlah sampel dalam penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus Federer untuk uji eksperimental.

$$(n - 1) (t - 1) \geq 15$$

Keterangan :

n = Jumlah sampel tiap kelompok

t = Jumlah kelompok kontrol dan perlakuan

Penelitian ini menggunakan 8 kelompok, sehingga perhitungan jumlah sampelnya sebagai berikut :

$$(n - 1) (t - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) (8 - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) (7) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14$$

Berdasarkan perhitungan di atas, jumlah sampel minimal yang dibutuhkan untuk setiap kelompok penelitian adalah 4 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar. Jumlah total tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah 32 ekor. Pengelompokan sampel dilakukan secara acak dengan *Simple Random Sampling*. Sampel yang terpilih dibagi menjadi 1 kelompok kontrol, 1 kelompok kontrol negatif, 3 kelompok kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus.

## 2. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

### a. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel pada penelitian ini adalah :

- 1) Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar.
- 2) Berusia 1 bulan.
- 3) Memiliki berat badan awal 150 - 200 gram.
- 4) Dalam keadaan sehat, lincah gerakannya, dan tidak terdapat kelainan anatomi.

b. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi sampel pada penelitian ini adalah :

- 1) Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang mati saat berlangsungnya penelitian.
- 2) Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang sakit saat berlangsungnya penelitian, dinilai dari berat badan dan keaktifannya.

**3. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan September - November 2018 dengan lokasi penelitian sebagai berikut :

- a. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan pada hewan coba dilakukan di Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- b. Pembuatan preparat histologi hepar dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Asri Medical Center.
- c. Pembedahan, pengamatan, penilaian preparat, dan pengumpulan data dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

## C. Variabel dan Definisi Operasional

### 1. Variabel

- a. Variabel bebas : pemberian serbuk kurma yang dijual di pasaran dan paparan pewangi ruangan untuk mobil berbentuk gel dengan aroma lemon.
- b. Variabel terikat : gambaran histologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang telah dipapar pewangi ruangan dan diinduksi serbuk kurma (*Phoenix dactylifera*) sesuai kelompok penelitian yang telah ditentukan.
- c. Variabel terkontrol :
  - 1) Sampel penelitian
    - a) Jenis kelamin : jantan
    - b) Usia : 1 bulan
    - c) Jenis tikus : *Rattus norvegicus* galur Wistar
  - 2) Perawatan sampel : makanan, minuman, dan jerami pada kandang setiap sampel memiliki jenis dan kualitas yang sama.
  - 3) Bahan coba : penggunaan serbuk kurma yang dijual di pasaran dan pewangi ruangan untuk mobil berbentuk gel dengan aroma lemon dalam merk yang sama.

### 2. Definisi Operasional

#### a. Pewangi Ruangan

Pewangi ruangan adalah deodoran yang digunakan untuk menyamarkan bau tidak sedap dengan menghasilkan aroma yang

menyegarkan (Kim *et al.*, 2015). Pewangi ruangan yang digunakan dalam penelitian ini berbentuk gel dengan aroma lemon yang biasa digunakan di dalam mobil dan telah diukur kandungan formaldehidnya sebelum digunakan. Pewangi ruangan yang digunakan memiliki merk dan spesifikasi yang sama. Pewangi ruangan dipaparkan selama 4 jam/hari dengan cara digantungkan pada kandang perlakuan.

#### **b. Serbuk Kurma**

Serbuk kurma (*Phoenix dactylifera*) adalah material halus seperti bubuk yang dihasilkan oleh bunga pohon kurma. Serbuk kurma yang digunakan dalam penelitian ini terbuat dari serbuk sari bunga kurma yang biasa dijual di pasaran dengan merk dan spesifikasi yang sama. Serbuk kurma diberikan dengan dosis bertingkat yaitu 120, 240, dan 360 mg/KgBB yang dilarutkan ke dalam akuades lalu diaduk sehingga berbentuk suspensi (Mehraban *et al.*, 2014). Perlakuan dengan serbuk kurma diberikan setiap hari pukul 12.00 siang selama 30 hari.

#### **c. Gambaran Histologi Hepar**

Gambaran histologi hepar adalah gambaran dari sel dan jaringan hepar yang diamati dengan mikroskop. Gambaran histologi hepar yang diamati pada penelitian ini adalah derajat kerusakan sel hepar yang dipapar pewangi ruangan dan serbuk kurma (*Phoenix dactylifera*). Preparat sel hepar diamati

menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 40 x 10 kali pada 5 lapang pandang berbeda yaitu pada keempat sudut dan bagian tengah preparat. Preparat yang diamati terdiri dari 25 sel hepar di sekitar vena centralis pada setiap lapang pandang. Derajat kerusakan sel hepar yang diamati diukur dengan skoring histopatologi hepar Manja Roenigk.

Sel hepar normal berbentuk poligonal, sitoplasmanya merah, dan dinding sel berbatas tegas dengan inti sel bulat (Mescher, 2012). Sel hepar normal diberi skor 1 berdasarkan skoring Manja Roenigk. Sel hepar yang mengalami degenerasi parenkimatosia memiliki sitoplasma yang merah keruh dengan sel yang membengkak dan terdapat granul-granul berupa endapan protein diberi skor 2 menurut skoring Manja Roenigk. Sel hepar yang mengalami degenerasi hidropik tampak membengkak dan terdapat vakuola jernih dalam sitoplasma yang pucat diberi skor 3 berdasarkan skoring Manja Roenigk. Sel hepar yang mengalami nekrosis menunjukkan perubahan inti sel yang semakin kecil, inti semakin basofil (gelap), dan kromatin yang berlipat-lipat diberi skor 4 menurut skoring Manja Roenigk (Kumar *et al.*, 2013).

## **D. Instrumen Penelitian**

### **1. Alat Penelitian**

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang tikus yang meliputi kandang pemeliharaan dan kandang perlakuan, perlengkapan pemeliharaan tikus, sonde, botol minum, bedah minor set, timbangan, tempat preparat basah (pot air), mikroskop binokuler, tisu, kapas, kertas koran, handscoon, masker, dan set gelas (cawan petri, pipet tetes, *object glass*, dan lain-lain).

### **2. Bahan Penelitian**

Bahan-bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini antara lain air mineral, pakan tikus standar, sekam padi, serbuk kurma (*Phoenix dactylifera*), pewangi ruangan gel dengan aroma lemon, kloroform, formalin *buffer* 10%, NaCl fisiologis, pikrat, dan akuades.

## **E. Cara Pengumpulan Data**

### **1. Persiapan Hewan Uji**

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan galur Wistar, usia 1 bulan, dan jenis kelamin jantan. Hewan uji ditimbang dan dipilih yang memenuhi berat badan 150 - 200 gram. Selanjutnya hewan uji diaklimatisasi selama 7 hari sebelum diberikan perlakuan.

## **2. Pengelompokan Hewan Uji**

Tikus yang memenuhi kriteria inklusi pada sampel diambil sebanyak 32 ekor lalu dibagi menjadi 8 kelompok yang terdiri dari 1 kelompok kontrol dengan kode K0, 1 kelompok kontrol negatif dengan kode P, 3 kelompok kontrol positif dengan kode K1, K2, dan K3, serta 3 kelompok perlakuan dengan kode PK1, PK2, dan PK3. Setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

## **3. Pemaparan Serbuk Kurma dan Pewangi Ruangan**

Pewangi ruangan digantungkan di tepi kandang perlakuan dan dilakukan pemaparan selama 4 jam/hari dalam waktu 30 hari sesuai kelompoknya. Serbuk kurma diberikan dengan dosis bertingkat yaitu 120, 240, dan 360 mg/KgBB yang dilarutkan ke dalam akuades lalu diaduk sehingga berbentuk suspensi (Mehraban et al., 2014). Serbuk kurma disiapkan setiap akan diberikan kepada subyek penelitian. Perlakuan dengan serbuk kurma diberikan setiap hari pukul 12.00 siang selama 30 hari.

## **4. Perlakuan**

Perlakuan pada hewan uji diberikan sesuai dengan pengelompokannya yaitu :

- a. Kelompok K0 adalah kelompok kontrol. Hewan uji pada kelompok ini tidak dipapar pewangi ruangan dan tidak diberi serbuk kurma.



- b. Kelompok P adalah kelompok kontrol negatif. Hewan uji pada kelompok ini dipapar pewangi ruangan selama 4 jam/hari dalam waktu 30 hari.
- c. Kelompok K1 adalah kelompok kontrol positif 1. Hewan uji pada kelompok ini diberi serbuk kurma dengan dosis 120 mg/KgBB setiap hari pukul 12.00 siang selama 30 hari.
- d. Kelompok K2 adalah kelompok kontrol positif 2. Hewan uji pada kelompok ini diberi serbuk kurma dengan dosis 240 mg/KgBB setiap hari pukul 12.00 siang selama 30 hari.
- e. Kelompok K3 adalah kelompok kontrol positif 3. Hewan uji pada kelompok ini diberi serbuk kurma dengan dosis 360 mg/KgBB setiap hari pukul 12.00 siang selama 30 hari.
- f. Kelompok PK1 adalah kelompok hewan uji yang dipapar pewangi ruangan selama 4 jam/hari dan diberi serbuk kurma dengan dosis 120 mg/KgBB setiap hari pukul 12.00 siang selama 30 hari.
- g. Kelompok PK2 adalah kelompok hewan uji yang dipapar pewangi ruangan selama 4 jam/hari dan diberi serbuk kurma dengan dosis 240 mg/KgBB setiap hari pukul 12.00 siang selama 30 hari.
- h. Kelompok PK3 adalah kelompok hewan uji yang dipapar pewangi ruangan selama 4 jam/hari dan diberi serbuk kurma dengan dosis 360 mg/KgBB setiap hari pukul 12.00 siang selama 30 hari.

## **5. Pemeliharaan**

Porsi dan jenis makanan serta minuman yang diberikan pada hewan uji sama untuk setiap kelompok. Makanan dan minuman diberikan setiap pagi. Pembersihan kandang tikus dan penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap 2 hari sekali.

## **6. Pembedahan dan Pengambilan Organ**

Pembedahan semua hewan uji dilakukan pada hari ke-31 dari awal pemberian perlakuan. Hewan coba diberikan anestesi terlebih dahulu berupa cairan kloroform sebelum dilakukan pembedahan. Setelah diberi anestesi, dilakukan pembedahan dengan bedah minor set lalu diambil organ yang akan diteliti yaitu hepar. Sebelum dibuat preparat histologi, organ hepar difiksasi dalam larutan formalin *buffer* 10% hingga terendam seluruhnya.

## **7. Pembuatan Preparat**

Organ hepar yang disimpan dalam larutan formalin *buffer* 10% dibuat preparat histologi dengan teknik parafin blok menggunakan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE).

## **8. Pengamatan Preparat**

Preparat diamati pada 100 sel hepar di sekitar vena centralis dengan perbesaran 40 x 10 kali pada 5 lapang pandang. Setelah itu, kerusakan sel hepar baik degenerasi parenkimatos, degenerasi hidropik, maupun nekrosis diberi skor berdasarkan skoring

histopatologi hepar Manja Roenigk. Sel hepar yang mengalami kerusakan kemudian dihitung jumlah skor kerusakannya.

#### **F. Analisis Data**

Data berupa hasil skor kerusakan sel hepar menurut skoring histopatologi hepar Manja Roenigk ditabulasi dan diuji normalitasnya dengan metode *Shapiro-Wilk*. Pengolahan data dilanjutkan dengan uji statistik parametrik menggunakan uji *One Way ANOVA* lalu uji *post hoc Duncan*.

#### **G. Etika Penelitian**

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang tidak lepas dari perlindungan hak tikus sebagai makhluk hidup. Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari menggunakan kandang dengan penutup kawat yang diberi botol air minum berisi air mineral dan diberi pakan standar tikus. Pemeliharaan diawasi langsung oleh peneliti, meliputi pemberian makanan dan minuman standar, pemberian pewangi ruangan gel dan serbuk kurma (*Phoenix dactylifera*), pembedahan, serta penyimpanan organ. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus dianastesi dengan kloroform lalu dibedah menggunakan bedah minor set. Organ hepar yang diambil dimasukkan ke dalam pot berisi larutan formalin *buffer* 10%. Setelah itu, dilakukan pembuatan preparat sesuai metode baku histologis pemeriksaan jaringan. Untuk menjamin legalitas

penelitian ini, peneliti telah mengajukan permohonan *Ethical Clearance* ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan telah disetujui dengan surat keterangan *Ethical Clearance* nomor 363/EP-FKIK-UMY/VIII/2018.