

III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode acak terkontrol. Menggunakan 20 ekor Tikus Wistar jantan berumur 10-16 minggu yang dipilih secara *random* dan dibagi menjadi 4 kelompok.

B. Tempat dan Waktu

Perlakuan dan pembuatan sari buah mengkudu yang akan digunakan pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Untuk pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Periode penelitian ini dilakukan selama kurang lebih 2 bulan.

C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah Tikus Wistar jantan berumur 10-16 minggu yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan kriteria sampel Frederer Menurut Frederer, rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah:

$$T(n-1) > 15$$

Dimana t adalah jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini akan menggunakan lima kelompok perlakuan sehingga penghitungan sampel menjadi:

$$4(n-1) > 15$$

$$4n - 4 > 15$$

$$4n > 19$$

$$n > 4,7$$

Jadi sampel yang digunakan minimal 5 ekor per kelompok perlakuan. Pada penelitian ini digunakan sampel sebanyak 20 ekor dan dipilih secara *random sampling*. Untuk keperluan penelitian ini digunakan 4 kelompok Tikus dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 Tikus Wistar. Adapun keempat kelompok Tikus ini terdiri dari:

1. Kelompok A merupakan kelompok Tikus yang tidak diberi minyak. Kelompok ini digunakan sebagai kelompok kontrol hanya diberikan air.

2. Kelompok B merupakan kelompok Tikus yang diberi minyak goreng bekas penggorengan lele dengan pemanasan selama 3 jam secara terus-menerus.
3. Kelompok C merupakan kelompok Tikus yang diberi minyak goreng bekas penggorengan lele dengan pemanasan selama 6 jam secara terus-menerus.
4. Kelompok D merupakan kelompok Tikus yang diberi minyak goreng bekas penggorengan lele dengan pemanasan selama 6 jam secara terus-menerus yang telah dimurnikan menggunakan sari buah mengkudu sebagai antioksidan.

Adapun Tikus yang digunakan pada penelitian ini memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut:

- Sehat
- Memiliki berat badan antara 200-250 gram
- Jenis kelamin jantan
- Berusia sekitar 10-16 minggu (dewasa)

Kriteria eksklusi pada penelitian ini diantaranya :

- Penampakan rambut kusam, rontok, botak dan aktivitas kurang/tidak aktif
- Keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, genital setelah masa adaptasi
- Terdapat penurunan berat badan $>10\%$ setelah masa adaptasi selama di laboratorium

D. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan yaitu :

- 1) Minyak goreng bekas
- 2) Sari buah mengkudu
- 3) Ketamine-xylazine
- 4) Formalin
- 5) Aquades

2. Alat penelitian

- 1) Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g, untuk menimbang berat Tikus
- 2) Sduit oral 3 cc
- 3) Minor set, untuk membedah perut Tikus (*laparotomy*)
- 4) Kapasal kohol
- 5) Mikrotom
- 6) Sonde
- 7) Kompor
- 8) Penggorengan
- 9) Tabung erlenmeyer
- 10) Saringan
- 11) Gelas ukur
- 12) Pot sampel

E. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh minyak hasil pemurnian dengan buah mengkudu terhadap histopatologi hepar pada hewan coba.

1. Pemilihan hewan coba

Penelitian ini dilakukan untuk menguji keamanan minyak hasil pemurnian pada hewan coba. Sebagai model dipilih Tikus Wistar. Tikus Wistar dipilih sebagai model hewan coba karena merupakan mamalia yang mempunyai tipe metabolisme sama dengan manusia. Dengan menggunakan Tikus, hasilnya dapat digeneralisasi pada manusia. Di samping itu, dengan menggunakan Tikus sebagai hewan coba, maka pengaruh diet dapat benar-benar dikendalikan dan terkontrol. Akan tetapi, hal ini juga mempunyai kelemahan karena manusia makannya lebih beragam, sehingga kondisi yang dicapai pada penelitian kemungkinan akan berbeda dengan kenyataan pada manusia. Namun demikian, hal ini merupakan pendekatan yang paling dapat dilaksanakan.

2. Prosedur pemberian minyak goreng bekas dan minyak hasil pemurnian

a. Pemilihan sampel minyak goreng bekas

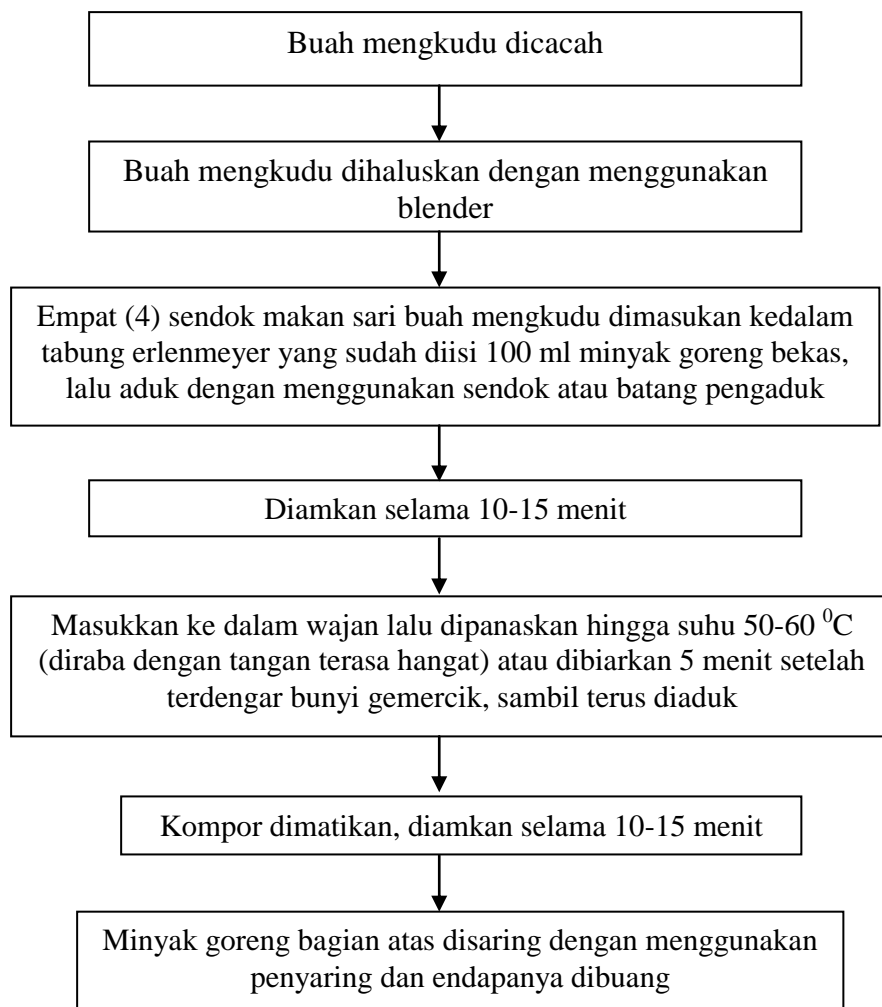
Kerusakan minyak goreng paling sering disebabkan oleh bahan yang digoreng mengandung protein dan air, suhu penggorengan yang tinggi, dan pemanasan secara terus menerus (Lawson, 1995). Oleh karena itu pada penelitian ini dipilih minyak goreng bekas penggorengan lele. Untuk perbandingan tingkat kerusakan minyak goreng, peneliti

memilih minyak goreng bekas lele yang digunakan selama 3 jam penggorengan dan 6 jam penggorengan secara berturut-turut.

b. Prosedur pemurnian minyak goreng bekas

Regenerasi minyak goreng bekas lele 6 jam penggorengan dengan menggunakan sari buah mengkudu dilakukan di Laboratorium Farmakologi FK Unila.

Cara pengolahan buah mengkudu adalah sebagai berikut :



Gambar 7. Diagram Alur Pengolahan Buah Mengkudu (Mahmudatussa, 2013)

c. Perhitungan dosis

Penelitian Thadeus (2005) menggunakan minyak goreng bekas secara oral dengan dosis 10uL/g BB/hari terbukti tidak toksik pada Tikus. Pada penelitian Rukhmini (2007) pemberian minyak goreng yang dicampur makanan dengan kadar minyak 20% dari jumlah pakan v/v, pengambilan sampel histopatologi hepar Tikus dilihat pada minggu ke 4 perlakuan, minggu ke 8 perlakuan dan minggu ke 12 perlakuan menunjukkan adanya kerusakan pada gambaran histopatologis hepar Tikus. Berdasarkan penelitian terdahulu tersebut, peneliti menggunakan dosis 10uL/g BB agar dapat diukur intake diet lemaknya dan dengan lama perlakuan 4 minggu.

Misalkan berat badan Tikus 200g maka perhitungannya adalah:

$$10\text{uL/gBB/hari} \times 200\text{g} = 2000\text{uL} = 2\text{ml} = 2\text{cc/hari}.$$

3. Prosedur Operasional Pembuatan Slide

a). *Fixation*

1. Spesimen berupa potongan organ telah dipotong secara representatif kemudian segera difiksasi dengan formalin 10% selama 3 jam.
2. Dicuci dengan air mengalir sebanyak 3–5 kali.

b). *Trimming*

1. Organ dicecilkan hingga ukuran ± 3 mm.
2. Potongan organ tersebut dimasukkan kedalam *tissue cassette*.

c). Dehidrasi

1. Mengeringkan air dengan meletakkan *tissue cassette* pada kertas tisu.

2. Dehidrasi dengan :

- Alkohol 70% selama 0,5 jam
- Alkohol 96% selama 0,5 jam
- Alkohol 96% selama 0,5 jam
- Alkohol 96% selama 0,5 jam
- Alkohol absolut selama 1 jam
- Alkohol absolut selama 1 jam
- Alkohol absolut selama 1 jam
- Alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam

d). *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan xilol I dan II masing–masing selama 1 jam.

e). *Impregnansi*

Impregnansi dilakukan dengan menggunakan parafin selama 1 jam dalam oven suhu 65°C.

f). *Embedding*

1. Sisa paraffin yang ada pada pan dibersihkan dengan memanaskan beberapa saat di atas api dan diusap dengan kapas.

2. Paraffin cair disiapkan dengan memasukkan paraffin ke dalam cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu di atas 58°C.

3. Paraffin cair dituangkan ke dalam pan.
4. Dipindahkan satu per satu dari *tissue cassette* ke dasar pan dengan mengatur jarak yang satu dengan yang lainnya.
5. Pan dimasukkan ke dalam air.
6. Paraffin yang berisi potongan hepar dilepaskan dari pan dengan dimasukkan ke dalam suhu 4–6⁰C beberapa saat.
7. Paraffin dipotong sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan skalpel/pisau hangat.
8. Lalu diletakkan pada balok kayu, diratakan pinggirnya dan dibuat ujungnya sedikit meruncing.

g). *Cutting*

1. Pemotongan dilakukan pada ruangan dingin.
2. Sebelum memotong, blok didinginkan terlebih dahulu di lemari es.
3. Dilakukan pemotongan kasar, lalu dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4–5 mikron. Pemotongan dilakukan menggunakan *rotary microtome* dengan *disposable knife*.
4. Dipilih lembaran potongan yang paling baik, diapungkan pada air dan dihilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.

5. Lembaran jaringan dipindahkan ke dalam *water bath* pada suhu 60°C selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
 6. Dengan gerakan menyendok, lembaran jaringan tersebut diambil dengan *slide* bersih dan ditempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah.
 7. *Slide* yang berisi jaringan ditempatkan pada inkubator (Suhu 37°C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.
- h). *Straining* (Pewarnaan) dengan Prosedur Pulasan *Hematoksilin–Eosin*:
- Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, dipilih slide yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut.
1. Dilakukan deparafinisasi dalam:
 - Larutan xylol I selama 5 menit
 - Larutan xylol II selama 5 menit
 - Ethanol absolut selama 1 jam
 2. Hydrasi dalam:
 - Alkohol 96% selama 2 menit
 - Alkohol 70% selama 2 menit
 - Air selama 10 menit
 3. Pulasan inti dibuat dengan menggunakan:
 - Harris hematoksilin selama 15 menit
 - Air mengalir
 - Eosin selama maksimal 1 menit

4. Lanjutkan dehidrasi dengan menggunakan:

- Alkohol 70% selama 2 menit
- Alkohol 96% selama 2 menit
- Alkohol absolut 2 menit

5. Penjernihan:

- Xylol I selama 2 menit
- Xylol II selama 2 menit

i). *Mounting* dengan entelan lalu tutup dengan *deck glass*

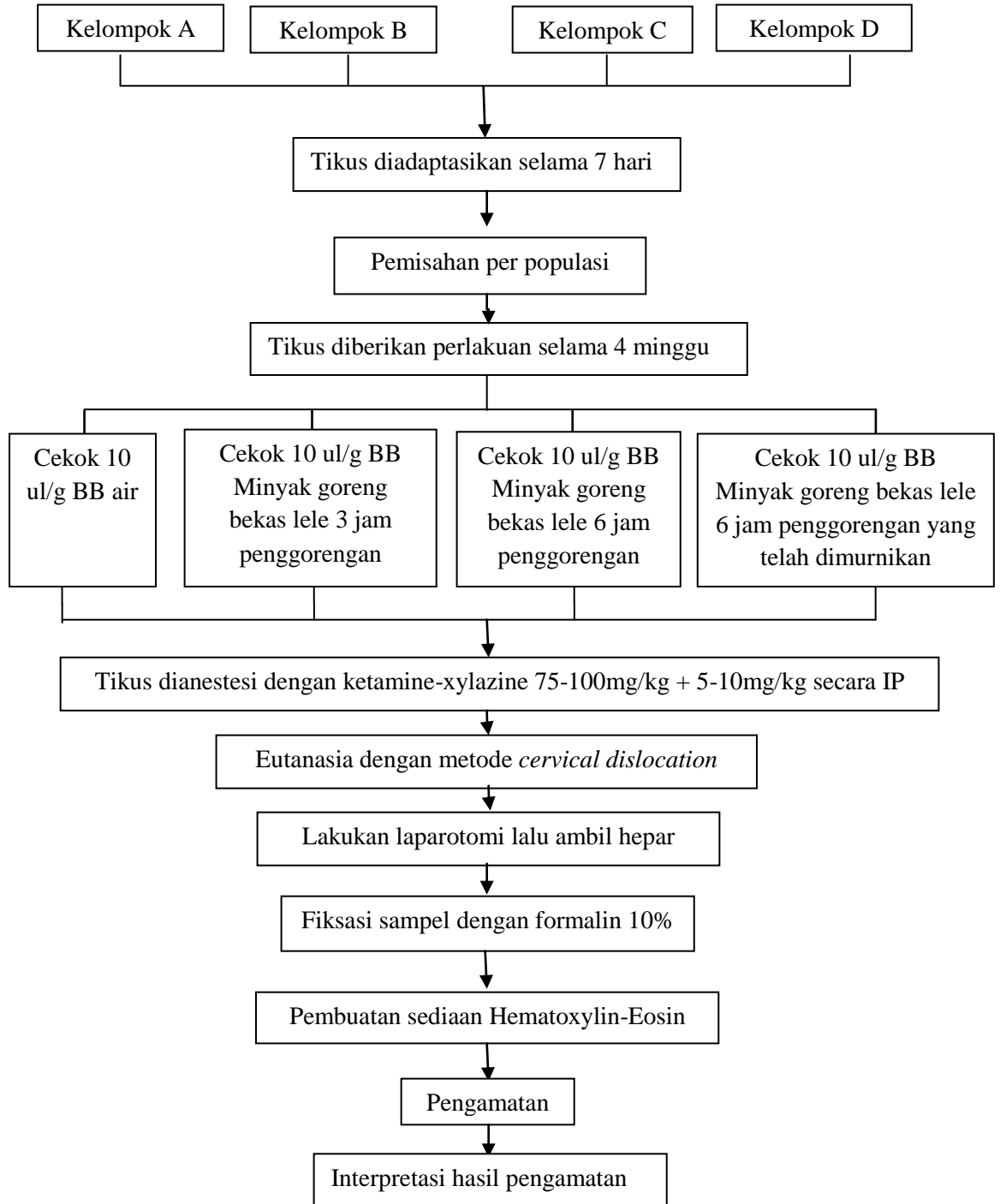
Setelah pewarnaan selesai, slide ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan mounting yaitu entelan dan ditutup dengan *deck glass*, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

j). *Slide* dibaca dengan mikroskop

Slide dikirim ke Laboratorium Patologi Anatomi, diperiksa dibawah mikroskop cahaya dan dibaca oleh ahli histologi dan patologi anatomi.

4. Prosedur penelitian

Adapun rancangan penelitian dari penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 8. Diagram Alur Penelitian

F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

Pada penelitian ini terdapat 2 variabel yakni variabel *dependen* (variabel terikat) dan variabel *independen* (variabel bebas). Adapun variabel penelitian pada penelitian ini adalah:

a. Variabel Bebas

Pemberian minyak goreng bekas yang dimurnikan dengan buah mengkudu (*Morinda citrifolia*)

b. Variabel Terikat

Gambaran hepatosit Tikus Wistar jantan

2. Definisi Operasional Variabel

Berikut definisi operasional dari variabel yang digunakan:

a. Pemberian minyak goreng bekas yang dimurnikan dengan buah mengkudu (*Morinda citrifolia*)

1. Kelompok A merupakan kelompok Tikus yang tidak diberi minyak. Kelompok ini digunakan sebagai kelompok kontrol hanya diberikan air.
2. Kelompok B merupakan kelompok Tikus yang diberi minyak goreng bekas penggorengan lele yang telah digunakan selama 3 jam penggorengan secara terus-menerus.
3. Kelompok C merupakan kelompok Tikus yang diberi minyak goreng bekas penggorengan lele yang telah digunakan selama 6 jam penggorengan secara terus-menerus.

4. Kelompok D merupakan kelompok Tikus yang diberi minyak goreng bekas penggorengan lele yang telah digunakan selama 6 jam penggorengan secara terus-menerus dan telah dimurnikan dengan sari buah mengkudu sebagai antioksidan.
- b. Gambaran histopatologi hepar Tikus Wistar jantan. Setiap Tikus dibuat preparat jaringan hepar dengan pewarnaan HE dan tiap preparat dibaca menggunakan mikroskop perbesaran objektif 400x. Kemudian dilakukan penilaian kerusakan hepar menggunakan 5 lapangan pandang. Setiap lapangan pandang yang di dalamnya terdapat edema/nekrosis hepatosit dianggap lapangan pandang tersebut mengalami kerusakan. Persentase kerusakan adalah jumlah hepatosit yang rusak dibandingkan dengan semua hepatosit yang ada pada lapangan pandang yang diamati.

G. Analisis data

Data akan dilakukan analisis dengan menggunakan program analisis data. Untuk uji normalitas data dilakukan uji Shapiro-Wilk karena jumlah sampel < 50 . Lalu dilakukan uji homogenitas dengan uji Levene. Apabila distribusi data normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *one way Anova*, kemudian dilanjutkan dengan *post hoc test* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna. Namun karena data tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji *one way anova*, maka diuji dengan uji *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan *Mann-Whitney*.

H. Etika Penelitian

Ilmuwan Penelitian kesehatan yang menggunakan model hewan menyepakati bahwa hewan coba yang menderita dan mati untuk kepentingan manusia perlu dijamin kesejahteraannya dan diperlukan secara manusiawi. Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba, juga harus diterapkan prinsip 3R data protokol penelitian, yaitu *replacement*, *reduction* dan *refinement*. Untuk itu penelitian ini diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, karena penelitian ini memanfaatkan hewan percobaan dalam pelaksanaannya.