

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental laboratorik* karena terdapat perlakuan dan kelompok kontrol pada hewan coba tikus serta menggunakan randomiasasi. Desain penelitian ini menggunakan *Control Group Post Test Design* (Notoatmojo, 2002 dalam Mahlianoor, 2009). Berikut ini merupakan 3 jenis perlakuan dan 2 kontrol yang dilakukan selama penelitian:

Kontrol negatif (K-) : diberi pakan standar

Kontrol positif (K+) : diberi pakan aterogenik

Perlakuan 1 (P1) : diberi pakan aterogenik + jus terong ungu dosis I

Perlakuan 2 (P2) : diberi pakan aterogenik + jus terong ungu dosis II

Perlakuan 3 (P3) : diberi pakan aterogenik + jus terong dosis III

4.2. Populasi dan Sampel

4.2.1. Jumlah Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah semua tikus putih jenis *Rattus Novergicus strain wistar*. Untuk menentukan jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini, maka peneliti menggunakan rumus :

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

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

$$(n-1) (5-1) > 15$$

$$n - 1 > 3,75$$

$$n = 5$$

Keterangan :

n : jumlah sampel

t : banyaknya perlakuan pada sampel

(Arkermen dan David, 2006 dalam Fadlia, 2011)

Dari hasil perhitungan diatas didapatkan jumlah sampel adalah 5 dan 1 cadangan. Jadi jumlah tikus yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah 30 ekor untuk 5 kelompok perlakuan.

4.2.2. Prosedur Pengambilan Sampel

Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokkan dan pemberian perlakuan menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap), hal ini karena hewan coba, tempat percobaan dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogen. Teknik randomisasi dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.2.3. Kriteria Subjek

a. Kriteria inklusi

1. Tikus putih jenis *Rattus Novergicus Strain wistar* jantan berusia 8-12 minggu.
2. Berat badan 100 – 200 gr.
3. Anggota badan lengkap, dan tidak cacat, gerakan aktif, mata jernih.
4. Warna bulu putih bersih.
5. Tikus dalam kondisi sehat yang ditandai dengan nafsu makan baik.

b. Kriteria eksklusi

1. Mengalami kelainan anatomi yang tidak sesuai dengan kriteria inklusi.

c. Drop Out

1. Tikus mengalami diare selama masa penelitian yang ditandai dengan feses tidak berbentuk dan atau mengalami penurunan berat badan.
2. Tikus mati selama masa perlakuan.
3. Tikus dinyatakan drop-out akan diganti dengan tikus lain yang sesuai dengan kriteria inklusi , sehingga didapat jumlah tikus sesuai ketentuan sampel.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas :

Variabel bebas pada penelitian ini adalah jus terong ungu (*Solanum melongena L.*) dengan berbagai dosis.

4.3.2. Variabel Tergantung :

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ketebalan dinding aorta pada tikus putih jenis *Rattus novergicus strain Wistar* jantan.

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1. Lokasi Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pemeliharaan hewan coba, serta Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya Malang untuk menghitung ketebalan dinding aorta.

4.4.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan dari bulan Desember 2012 – Februari 2013.

4.5. Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

1. Diet normal

Berupa comfeed PARS dan tepung terigu perbandingan 2 : 1 dengan ditambahkan air secukupnya (PARS 53%, tepung terigu 23,5%, air 23,5%). Diet normal diberikan 40 gram setiap hari per tikus pada semua kelompok saat masa adaptasi dan pada kelompok kontrol negatif saat masa perlakuan (Murwani *dkk*, 2005 dalam Palupi, 2012)

2. Diet aterogenik

Diberikan 40 gram setiap hari per tikus (Murwani, 2006) atau sesuai dengan perhitungan kebutuhan energi tikus, diberikan pada kelompok perlakuan (P2, P3, P4) dan kelompok kontrol positif. Komposisi bahan diet aterogenik dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.1 Komposisi Bahan Diet Aterogenik (40 gram per sajian)

| Bahan | % | Berat (gram) |
|--------------------|------------|--------------|
| Comfeed PARS | 50 | 20 |
| Tepung terigu | 25 | 10 |
| Kuning telur bebek | 5 | 2 |
| Lemak kambing | 10 | 4 |
| Minyak kelapa | 1 | 0,4 |
| Minyak babi | 8,9 | 3,55 |
| Asam kolat | 0,1 | 0,05 |
| TOTAL | 100 | 40 |

(Sumber : Palupi, 2012)

3. Jus Terong Ungu

Hasil buah terong ungu yang diblender sehingga menjadi sediaan jus. Terong ungu yang digunakan pada penelitian ini adalah terong ungu yang berbentuk lonjong. Jus terong ungu diberikan kepada tikus putih menggunakan sonde lambung. Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Novita Fadlia pada tahun 2011 , peneliti menggunakan dosis terong ungu yang telah digunakan oleh Wijayakusuma (2004) pada manusia, yaitu

sebanyak 100 gram. Kemudian dilakukan perhitungan dosis jus terong dengan memperhatikan faktor konversi berat badan manusia (70 kg) ke berat badan tikus (200 gram) yaitu 0,018. Rata-rata berat badan orang Indonesia adalah 50 kg. Dosis terong ungu pada manusia 50 kg dikonversi ke tikus putih 200 gr adalah :

a. Dosis 50 gram/50 kg BB manusia

$$\begin{aligned} &= 50/70 \times 50 \text{ gram} \times 0.018 \\ &= 0,6 \text{ gr}/200 \text{ gr BB tikus putih} \end{aligned}$$

b. Dosis 100 gram/50 kg BB manusia

$$\begin{aligned} &= 100/70 \times 50 \text{ gram} \times 0.018 \\ &= 1,3 \text{ gr}/200 \text{ gr BB tikus putih} \end{aligned}$$

c. Dosis 200 gram/50 kg BB manusia

$$\begin{aligned} &= 200/70 \times 50 \text{ gram} \times 0.018 \\ &= 2,6 \text{ gr}/200 \text{ gr BB tikus putih} \end{aligned}$$

Penelitian tersebut menggunakan dosis 0,6gr/3ml, 1,3gr/3ml dan 2,6gr/3ml dan dosis optimal yang dapat mempengaruhi hasil penelitian adalah 2,6ml/3ml (Fadlia, 2011). Oleh karena itu, dosis jus terong yang digunakan pada penelitian ini adalah 1,3gr/3ml, 2,6gr/3ml dan 5,2gr/3ml.

Cara pembuatan jus terong ungu :

1) Terong ungu dicuci bersih kemudian dipotong kecil-kecil dan ditimbang sesuai berat yang dibutuhkan:

a) Dosis I = 1,3 gr x 6 ekor tikus putih
= 7,8 gr terong ungu

b) Dosis II = 2,6 gr x 6 ekor tikus putih
= 15,6 gr terong ungu

- c) Dosis III = 5,2 gr x 6 ekor tikus putih
= 31,2 gr terong
- 2) Terong ungu yang sudah ditimbang ditambahkan air sebanyak 10 ml kemudian diblender. Setelah terbentuk sediaan jus ditambahkan air sampai didapatkan volume 18 ml. Cara tersebut diulang untuk tiap dosis perlakuan sehingga akan didapatkan:
- a) Dosis I : 3 ml jus yang mengandung 1,3 gr terong ungu
b) Dosis II : 3 ml jus yang mengandung 2,6 gr terong ungu
c) Dosis III : 3 ml jus yang mengandung 5,2 gr terong ungu
4. Bahan pemeriksaan ketebalan dinding aorta : Formalin 10 %, Aseton, Xylol, Parafin cair, Alkohol 80% dan 96% , Hematoxylin, Alkohol Asam, Eosin (Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya)

4.5.2 Alat/instrumen Penelitian

1. Alat pembuatan makanan hewan coba
Timbangan, neraca analitik, waskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan dan nampan
2. Alat pemeliharaan hewan coba
Bak plastik, kandang tikus terbuat dari anyaman kawat, botol air dan sekam
3. Alat pengambilan sampel pembuluh darah aorta
Seperangkat alat bedah minor, kapas, tempat menyimpan pembuluh darah aorta, termos es, beaker glass, mortar
5. Alat untuk mengukur penebalan dinding intima media
Menggunakan scan dot dan hasilnya dinyatakan sebagai IMT (Intima Media Thickness)

4.6. Definisi Operasional

4.6.1. Diet Normal

Pakan yang diberikan pada tikus percobaan dengan komposisi Comfeed PARD, tepung terigu dan air secukupnya. Diberikan pada saat adaptasi selama satu minggu dan pada kelompok kontrol negatif selama 8 minggu (Palupi, 2012). Alur pembuatan pakan diet normal terdapat pada lampiran 2.

4.6.2. Diet Aterogenik

Pakan yang diberikan kepada tikus dengan komposisi Comfeed PARS, tepung terigu, kuning telur bebek, elmak kambing, minyak kelapa, minyak babi dan asam kolat yang diberikan kepada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3) setelah masa adaptasi (Palupi, 2012). Alur pembuatan pakan diet aterogenik terdapat pada lampiran 3

4.6.3. Jus Terong Ungu

Jus terong ungu adalah buah terong ungu yang diblender sehingga menjadi sediaan jus. Terong ungu yang dipakai dalam penelitian ini adalah terong ungu yang berbentuk lonjong. Jus terong ungu diberikan kepada tikus putih menggunakan sonde lambung (Fadlia, 2011). Terong ungu didapatkan dari satu tempat yang sama yaitu Toko Buah Lai-Lai di Jl. Arjuno no 36 Malang dengan *supplier* tetap dari kota Batu.

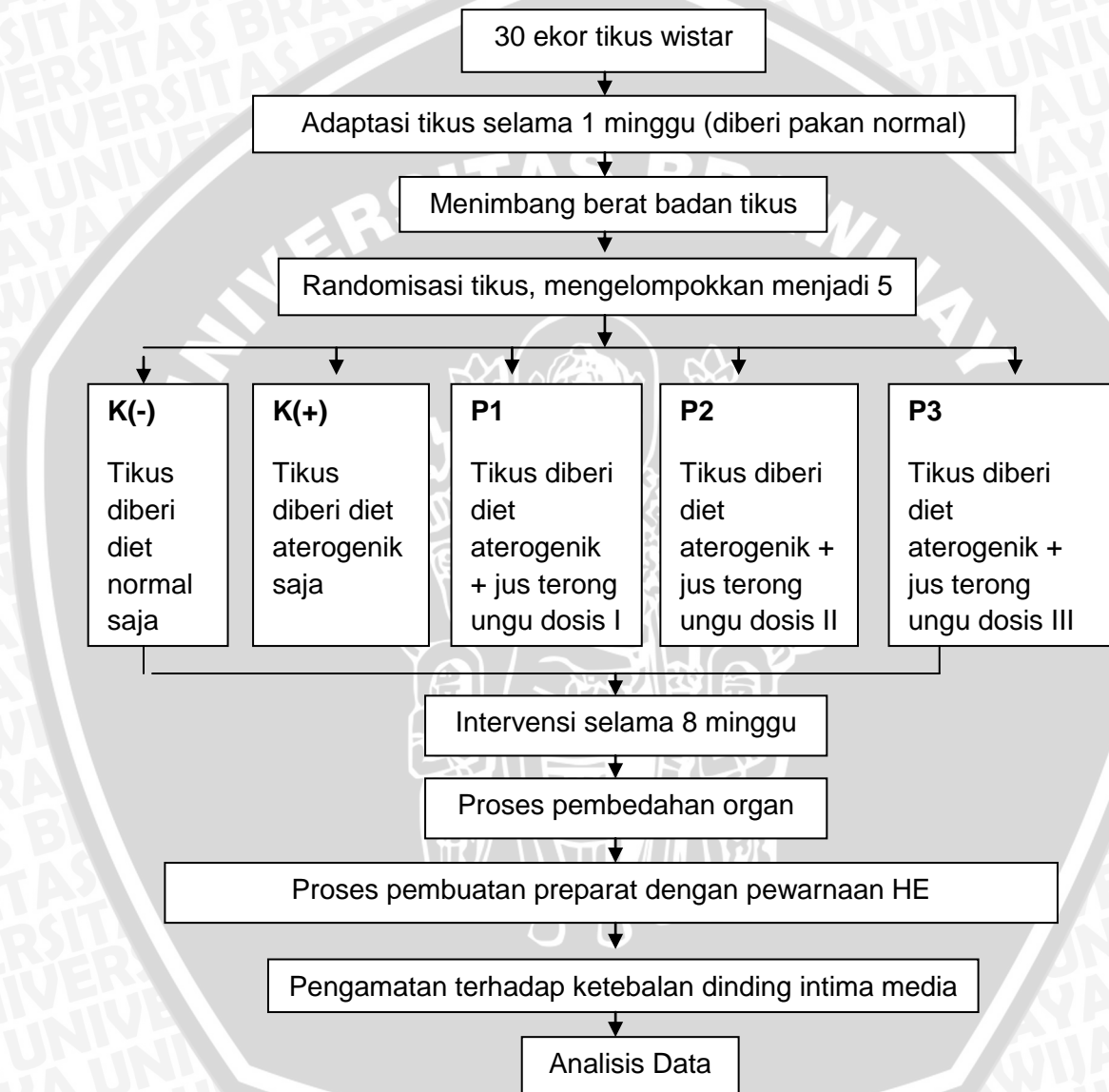
4.6.4. Ketebalan dinding aorta

Ketebalan dinding aorta adalah pengukuran ketebalan aorta dari tunika intima sampai tunika media (pada potongan melintang aorta dalam

satuan mikron yang dipulas dengan Hemaktosilin Eosin), diamati dengan mikroskop yang dilengkapi *ocular micrometer*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Langkah-langkah dalam pelaksanaan penelitian ini adalah:



Gambar 4.1 Alur penelitian

4.7.2 Prosedur Pengambilan Organ

Tikus yang akan dibedah dianestesi terlebih dahulu dengan cara dimasukkan ke dalam kotak tertutup yang di dalamnya terdapat kapas

yang diberi eter. Tikus dibiarkan lemas, kemudian dibedah dan diambil organ pembuluh aorta dan dibersihkan dengan Phospat Buffer Saline (PBS), lalu disimpan di lemari es (freezer) pada suhu 20°C. Setelah itu organ dipotong dengan cryostat section sepanjang 0,1 μm . Potongan difiksasi dengan formalin 10% selama 10 menit kemudian dibuat sediaan histopatologi (preparat) dengan pewarnaan HE (Hematoksilin-Eosin) (Berata *dkk.*, 2010).

4.7.3 Pembuatan Preparat Histopatologi

4.7.3.1 Proses Pemotongan Jaringan

Setelah pembedahan organ hewan coba dan difiksasi selama 1 malam, kemudian organ dipotong kurang lebih dengan ketebalan 2 – 3 mm dan memasukkannya ke kaset dan memberi kode sesuai dengan kode organnya. Setelah itu potongan jaringan tersebut di masukkan ke dalam larutan formalin 10% kemudian diproses menggunakan *Tissue Tex Processor* (Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya, 2012).

4.7.3.2 Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan

Setelah pemrosesan menggunakan *Tissue Tex Processor*, jaringan diambil untuk diblok dengan menggunakan paraffin sesuai dengan ukuran tempat blok di mikrotom. Kemudian jaringan dipotong dengan mikrotom dengan ketebalan 3 - 5 mikron (Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya, 2012).

4.7.3.3 Proses deparafinisasi

Setelah disayat atau dipotong dengan ketebalan 3-5 mikron, selanjutnya jaringan diletakkan dalam oven selama 30 menit dengan suhu 50-70 derajat. Kemudian dimasukkan ke dalam dua tabung larutan xylol

masing-masing selama 20 menit . setelah itu dimasukkan ke alkohol 3 tempat masing-masing 3 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit (Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya, 2012). Proses deparafinisasi ini bertujuan untuk menghilangkan sisa parafin pada jaringan yang akan di cat (Mahlianoor, 2009).

4.7.3.4 Pewarnaan dengan Hemaktosilin-Eosin

Pada proses pewarnaan dengan HE, potongan jaringan di masukkan ke dalam Hematoksilin selama 10 – 15 menit, kemudian ke dalam air mengalir selama 15 menit, alkohol asam 1% sebanyak 7 – 10 menit celupan, amonia sebanyak 3 – 5 celup dan ke dalam eosin 1% selama 15 menit (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2012).

4.7.3.5 Dehidrasi

Jaringan dimasukkan ke dalam alkohol yaitu alkohol 96% (I) , alkohol 96% (II) dan alkohol 80%(III) masing-masing selama 3 menit (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2012).

4.7.3.6 Penjernihan (*Clearing*)

Jaringan dimasukkan ke dalam larutan xylol selama 15 menit sebanyak 2 kali

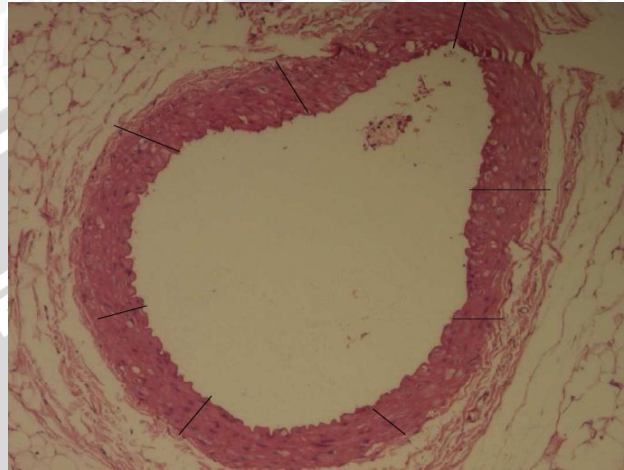
4.7.3.7 Mounting

Pemasangan *deckglass* dengan menggunakan entelan sebagai perekat.

4.7.4 Pemeriksaan Sediaan Mikroskopis

Pemeriksaan dan pengukuran ketebalan penampang aorta dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400X (okuler 10x, obyektif 40x) dari tunika intima sampai tunika media pada 8 zona (Jam 12.00 , 13.30, 15.00 , 19.30, 21.00 , dan 22.30) (Sampurna,2003).

Ketebalan aorta dikonversi dalam persen (dengan membandingkan ukuran ketebalan aorta dengan kelompok kontrol). Bila lebih dari normal, disebut dinding menebal (Maliya,2006)



Gambar 4.2 Zona pengukuran ketebalan penampang aorta (Maliya,2006)

4.8. Pengumpulan Data

1. Data berat badan tikus diperoleh dari hasil penimbangan berat badan tikus yang dilakukan 1 minggu sekali
2. Data asupan pakan tikus diperoleh dari selisih antara berat pakan awal dikurangi sisa pakan (waste) yang dilakukan setiap hari
3. Data ketebalan dinding aorta diketahui dari hasil pemeriksaan laboratorium pada sampel saat akhir penelitian yang diukur .

4.9 Analisa Data

Data yang didapat dianalisis dengan program SPSS (*Statistical Pockage fo Social Science*) for windows versi 16 secara statistik dengan menggunakan uji *one-way* ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan ketebalan aorta pada masing-masing kelompok perlakuan Jika terdapat perbedaan maka dapat dilanjutkan dengan uji Tuckey untuk mengetahui

perbedaan tiap kelompok. Uji statistik dilakukan pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$), perbedaan dikatakan bermakna jika $p < 0,05$.

