

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan studi eksperimental *in vivo* pada hewan coba tikus wistar (*Rattus norvergicus*) dengan metode *post test control group design*. Perbandingan yang digunakan dalam metode ini adalah hasil yang didapat setelah perlakuan dengan menggunakan kontrol positif, kontrol negatif, dan perlakuan dosis.

4.2. Subyek Penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus jenis *Rattus norvergicus* berkelamin jantan dengan berat badan antara 100-150 gr, dipelihara dalam kandang dengan ventilasi terbuka. Tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok dengan rincian sebagai berikut.

1. ND (Normal Diet sebagai kontrol negatif): kelompok tanpa diet aterogenik dan tanpa diberikan ekstrak kulit manggis
2. HFD (High Fat Diet sebagai kontrol positif): kelompok dengan diet aterogenik dan tanpa pemberian ekstrak kulit manggis
3. EKM A1: kelompok dengan pemberian diet aerogenik, pemberian EKM dosis 200 mg selama 3 bulan
4. EKM A2: kelompok dengan pemberian diet aerogenik, pemberian EKM dosis 400 mg selama 3 bulan
5. EKM A3: kelompok dengan pemberian diet aerogenik, pemberian EKM dosis 800 mg selama 3 bulan
6. EKM B1: kelompok dengan pemberian diet aterogenik, pemberian EKM dosis 200 mg dimulai bulan ke 2 sampai bulan ke 3
7. EKM B2: kelompok dengan pemberian diet aterogenik, pemberian EKM dosis 400 mg dimulai bulan ke 2 sampai bulan ke 3
8. EKM B3: kelompok dengan pemberian diet aterogenik, pemberian EKM dosis 800 mg dimulai bulan ke 2 sampai bulan ke 3

9. HFD 1 Bulan: kelompok pemberian diet aterogenik selama 1 bulan, untuk melihat sudah terbentuknya atau belum sel busa

4.2.1. Estimasi Besar Subyek Penelitian

Jumlah tikus yang dipakai dalam penelitian ditentukan berdasarkan Arikunto (2010) sebagai berikut:

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Apabila p = jumlah perlakuan, n = jumlah pengulangan, dan 15 = nilai deviasi, maka jumlah pengulangan dalam satu kelompok dilakukan minimal sebanyak 4. Dalam setiap pengulangan, peneliti memutuskan untuk menambahkan 2 ekor tikus sebagai cadangan, maka tikus yang dibutuhkan tiap satu kelompok adalah sebanyak 6 ekor. Sehingga, jumlah total keseluruhan sampel adalah 9×6 ekor = 54 ekor tikus.

4.2.2. Kriteria Inklusi

1. Jenis kelamin jantan
2. Berumur 4 minggu
3. Berat badan 100-150 gram
4. Tikus dalam kondisi sehat (bulu putih, mata jernih, dan lincah)

4.3. Variabel Penelitian

4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis EKM yang diberikan yaitu 200, 400, dan 800 mg/hari.

4.3.2 Variabel Terikat

Variable terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel busa pada aorta.

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1. Pemeliharaan Hewan Coba

Pemeliharaan dan perlakuan pada hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada tenggang waktu selama 3 bulan (Bulan Juni-September).

4.4.2. Pembedahan Hewan Coba

Pembedahan hewan coba dilakukan selama 10 hari (4 ekor perhari) di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dimulai tanggal 26 Agustus hingga 10 September 2013.

4.4.3. Pembuatan Slide

Pembuatan slide dengan paraffin blok dilakukan pada 52 sampel di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sedangkan pembuatan slide dengan frozen section dilakukan pada 4 sampel di lab Patologi Anatomi Rumah Sakit Islam Aisiyah.

4.4.4. Pengecatan Sel Busa

Pengecatan dan perhitungan Sel Busa dengan menggunakan HE dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1. Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Tikus

Alat yang digunakan saat pemeliharaan tikus adalah kandang tikus, penutup kandang dari anyaman kawat, botol air, dan timbangan.

4.5.2. Alat dan Bahan untuk Pembedahan Tikus

Gunting bedah, steroform, pinset, kapas, jarum, alat bedah untuk pengambilan aorta (cawan petri), wadah tertutup untuk penyimpanan organ, kloroform 20 ml.

4.5.3. Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Sel Busa

4.5.3.1. Pewarnaan sel busa dengan HE

Pewarnaan dengan HE dilakukan setelah sampel difiksasi dengan formalin 10%. Lalu, alat dan bahan yang dibutuhkan untuk proses ini adalah alcohol, preparat, slide glass, mikroskop dengan pembesaran 400x, alcohol bertingkat, alcohol absolute,

larutan xylol, paraffin cair, albumin, bahan pengecatan HE, balsam canada, dan entelan.

4.6. Definisi Operasional

1. HFD (High Fat Diet)

High fat diet adalah pemberian makanan tinggi lemak terhadap tikus berusia 4 minggu selama 3 bulan dengan komposisi PAR-S 53%, tepung terigu 26,5%, minyak kambing 0,1%, minyak kelapa 2%, asam kolat 0,0013%, minyak babi 3,22%, dan 2 butir telur bebek.

2. Sel Busa

Sel busa adalah jumlah sel busa yang dihitung secara manual oleh peneliti dengan bantuan *cell counter* sebagai acuan dalam mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit manggis terhadap proses aterosklerosis. Setiap preparat akan dihitung manual dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

3. EKM (Ekstrak Kulit Manggis)

Ekstrak kulit manggis adalah pemberian ekstrak kulit manggis terhadap tikus dengan dosis 200, 400, dan 800 mg perhari.

4.7. Randomisasi dan Desain Lay Out

Agar setiap percobaan mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan, maka dalam pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan diperoleh hasil sebagai berikut.

Tabel 4.1 Data Ulangan Randomisasi

Perlakuan	Ulangan					
	1	2	3	4	5	6
ND	R01	R02	R03	R04	R05	R06
HFD	R07	R08	R09	R10	R11	R12
EKM A1	R13	R14	R15	R16	R17	R18

EKM A2	R19	R20	R21	R22	R23	R24
EKM A3	R25	R26	R27	R28	R29	R30
EKM B1	R31	R32	R33	R34	R35	R36
EKM B2	R37	R38	R39	R40	R41	R42
EKM B3	R43	R44	R45	R46	R47	R48
HFD 1 BULAN	R49	R50	R51	R52	R53	R54

4.8. Cara Kerja

4.8.1. Persiapan Penelitian

- Alat dan bahan penelitian dipersiapkan
- Bahan diet, kandang, dan alat untuk pemeliharaan hewan coba disiapkan
- Hewan coba diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama 13 hari, pada ruangan bersuhu kamar (sekitar 22-25°C), bersiklus gelap terang

4.8.2. Proses Perlakuan Pada Tikus

Diet aterogenik yang diberikan adalah pakan tinggi kolesterol yang diformulasi khusus untuk menimbulkan keadaan aterosklerosis pada hewan coba dengan komposisi PAR-S 53%, tepung terigu 26,5%, Minyak kambing 0,1%, minyak kelapa 2%, asam kolat 0,0013%, minyak babi 3,22%, dan dua butir telur bebek (Sargowo, 2013).

4.8.3. Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis

Prosedur pembuatan ekstrak kulit manggis yang akan diberikan sebagai intervensi adalah sebagai berikut.

- Proses pengeringan

- Cuci bersih bahan alam (sampel basah) yang akan dikeringkan
- Potong kecil kecil
- Lalu oven dengan suhu 80°C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air)

2. Proses Ekstraksi

- Setelah kering, haluskan dengan blender sampai halus
- Timbang sebanyak 100 gr sampel kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter
- Kemudian rendam dengan etanol sampai volume 1000 ml.
- Kocok sampai benar-benar tercampur (kurang lebih 30 menit)
- Didiamkan 1 malam sampai mengendap

3. Proses Evaporasi

- Ambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terambil
- Masukkan dalam labu evaporasi 1 liter
- Pasang labu evaporasi pada evaporator
- Isi water bath dengan air sampai penuh
- Pasang semua rangkaian alat, termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (atur sampai 90°C) sambungkan dengan aliran listrik
- Pisahkan ekstrak dan larutan etanolnya

4.8.4. Pembuatan Slide dan Pengecatan Sel Busa

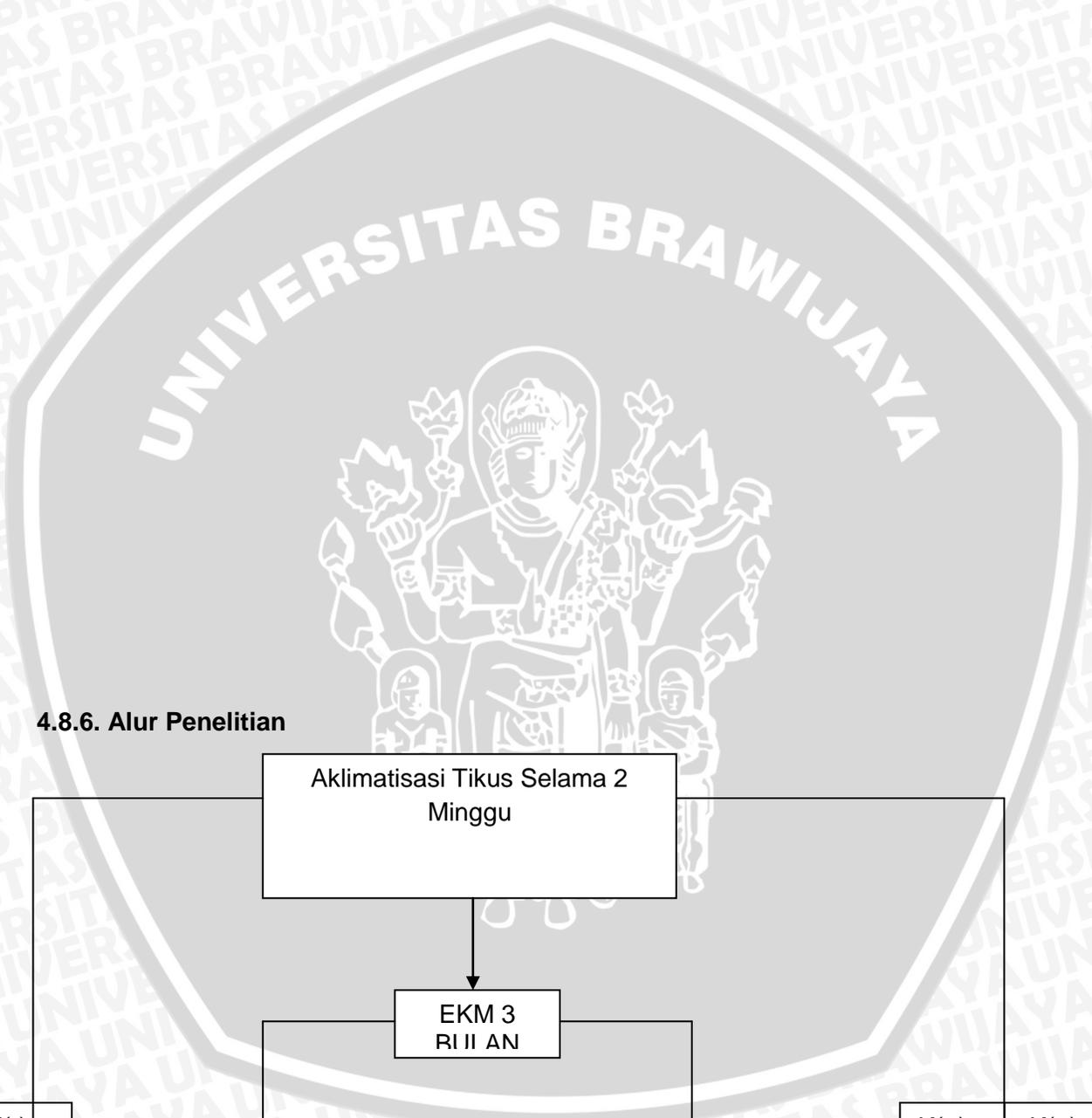
4.8.4.1. Pembuatan Preparat Histopatologi dengan Parafin Blok

Pembuatan preparat histopatologi arteri ekor dan arteri karotis dimulai dari fiksasi dengan formalin 10%, dilanjutkan dengan pemotongan jaringan, pengeblokan dengan parafin, deparafinisasi, pewarnaan HE, dehidrasi dan penjernihan (clearing).

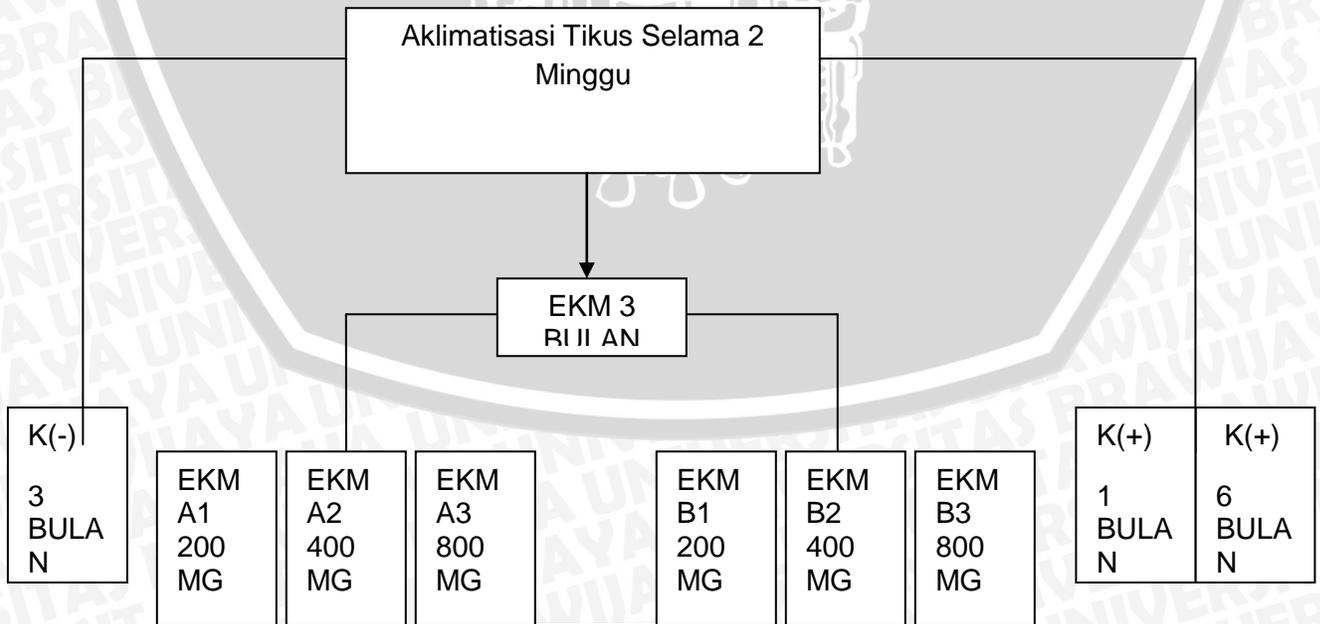
4.8.5. Perhitungan Sel Busa

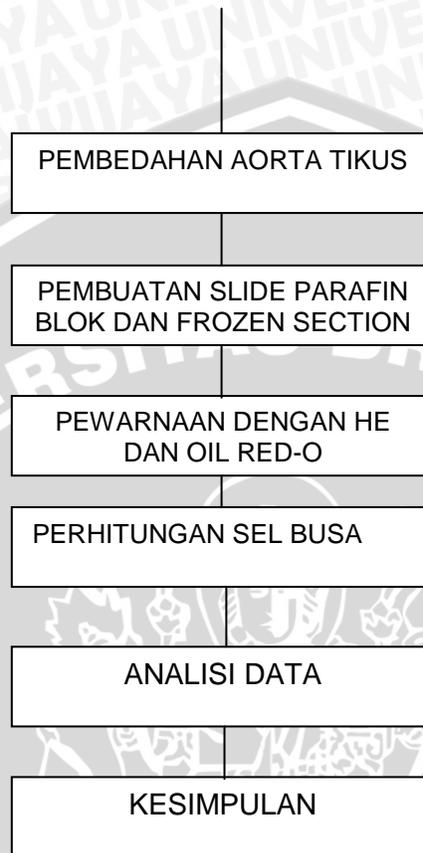
Sel busa adalah sel yang berbentuk seperti busa, yang merupakan hasil dari makrofag yang memakan LDL yang teroksidasi, dilihat di bawah mikroskop dengan pewarnaan Oil Red O akan berwarna merah. Yang dihitung adalah jumlah sel busa yang ada di cell endotel perlapangan pandang pada pembesaran 100 hingga 400 kali. Sampel diambil dari potongan melintang dinding pembuluh darah aorta yang telah beku dengan alat microtome (Cryo-Cut) setipis 3-5 mikron dan telah

diperlakukan untuk pewarnaan Oil Red O (Schieffer B. etal., 2004; Ika Fikriah, 2007).



4.8.6. Alur Penelitian





4.8.7. Data yang Dikumpulkan

- a. Jumlah intake harian tikus
- b. berat badan tikus
- c. jumlah sel busa

4.8.8. Cara Pengumpulan Data

- a. Jumlah intake harian tikus
 Jumlah intake harian tikus dihitung melalui selisih pakan yang diberikan dengan sisa paka tikus
- b. Berat badan tikus

Berat badan tikus diketahui melalui penimbangan setiap minggu

c. Jumlah sel busa

Jumlah foam cell dihitung secara manual dengan bantuan cell counter dan menggunakan mikroskop perbesaran 400X dengan 20 kali lapang pandang.

4.9. Cara Penganalisis Data

Setelah data jumlah foam cell diperoleh, akan dilakukan uji normalitas terhadap distribusi data dengan menggunakan uji *Kolmogorov-smirnov* dengan nilai harapan $p > 0,05$ dan selanjutnya dilakukan uji beda. Dilakukan uji homogenitas *Levenne-test* untuk melihat nilai signifikansinya. Jika data yang diperoleh normal dan signifikan, maka dilakukan uji parametrik *one way annova*, namun bila data tidak normal dilanjutkan dengan uji non parametrik *kruskal walls*. Uji ini merupakan uji statistik inferensial yang memungkinkan para peneliti dapat menguji apakah dua atau lebih rerata dari kelompok-kelompok itu berbeda atau tidak, dan menguji apakah varian populasi sama atau tidak. Selanjutnya dilakukan uji korelasi, jika data normal maka dilakukan uji korelasi *pearson*, dan jika data tidak normal maka dilakukan uji *spearman*.