

## BAB IV

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorik *in vivo* terhadap tikus putih dengan 3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol. Penelitian bersifat preventif sehingga dilaksanakan dengan *Post test Only Controlled Group Design*. Dengan metode ini peneliti dapat membandingkan kelompok eksperimental dengan kelompok kontrol. Pemilihan objek penelitian untuk pengelompokan dalam perlakuan menggunakan metode *Simple Random Sampling* karena tikus, bahan pakan tikus, dan tempat penelitian dapat dikatakan homogen.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

##### 4.2.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah hewan coba tikus putih atau *Rattus Norvegicus strain Wistar*. Pemilihan hewan coba ini dikarenakan sifatnya sebagai hewan coba memiliki keterdekatan dengan manusia. Selain itu tikus putih merupakan hewan mamalia pemakan segala (omnivora) yang mudah berkembang biak dan mudah mendapat perlakuan. Tikus putih juga memiliki struktur esophagus yang langsung bermuara ke lambung, sehingga tidak dapat memuntahkan makanannya dan tidak memiliki kandung empedu.

#### 4.2.2 Kriteria Inklusi

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan.

Pemilihan hanya satu jenis kelamin agar sampel bersifat homogen.

Pemilihan jenis kelamin jantan untuk meminimalkan faktor pengganggu metabolisme lipid misalnya adanya hormon estrogen.

2. Usia 2 – 3 bulan
3. Berat badan 150-250 gram
4. Sehat, tingkah laku dan aktifitas normal
5. Bulu putih, halus, dan mengkilat
6. Kadar gula darah acak <126 mg/dL

#### 4.2.3 Kriteria Eksklusi

1. Tikus cacat tidak bergerak aktif
2. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
3. Tikus yang sebelumnya pernah digunakan untuk eksperimen lain

#### 4.2.4 Perhitungan Sampel

Perhitungan jumlah sampel berdasarkan rumus Kemas (2005) adalah sebagai berikut:

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

Dimana :

n = jumlah pengulangan/besar sampel dalam kelompok

t = jumlah perlakuan/banyaknya kelompok (5 kelompok)

Maka jumlah sampel yang dibutuhkan dalam kelompok adalah :

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4.75 \text{ dibulatkan menjadi } 5$$

Jumlah sampel untuk 5 kelompok adalah  $5 \times 5 = 25$  ekor tikus. Jumlah 25 ekor tikus adalah jumlah minimal sampel. Peneliti menambahkan 1 ekor tikus sebagai cadangan untuk tiap kelompok maka total jumlah sampel adalah 30 ekor tikus dengan 6 ekor tikus tiap kelompok perlakuan.

#### 4.2.5 Randomisasi Sampel

Seluruh tikus sampel yang tersedia dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan berdasarkan *Simple Random Sampling* sehingga tiap tikus memiliki peluang yang sama untuk semua kelompok. Teknik *Simple Random Sampling* dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Memberikan bilangan acak pada tiap tikus. Umumnya menggunakan 3 angka acak.
2. Memberi ranking pada tiap tikus sesuai angka acak yang telah dibuat. Angka ranking ini menjadi kode untuk tiap tikus.
3. Mengelompokkan tikus menjadi 5 kelompok berdasarkan angka ranking.

#### 4.2.6 Penentuan Perlakuan

Pada rancangan penelitian ini, sampel dibagi kedalam 5 kelompok perlakuan, yaitu :

Perlakuan I : Pemberian diet normal (kelompok kontrol negatif), yaitu tikus yang tidak diinduksi STZ dan tanpa pemberian *high fat diet*

- Perlakuan II : Pemberian *high fat diet*, kemudian tikus diinduksi STZ (kelompok kontrol positif) namun tanpa diterapi dengan susu sapi bubuk
- Perlakuan III : Pemberian *high fat diet*, kemudian tikus diinduksi STZ dan diberikan terapi susu sapi bubuk 0,9 gram dengan kandungan vitamin D 9 IU dan kalsium 10,8 mg.
- Perlakuan IV : Pemberian *high fat diet*, kemudian tikus diinduksi STZ dan diberikan terapi susu sapi bubuk 1,8 gram dengan kandungan vitamin D 18 IU dan kalsium 21,6 mg.
- Perlakuan V : Pemberian *high fat diet*, kemudian tikus diinduksi STZ dan diberikan terapi susu sapi bubuk 2,7 gram dengan kandungan vitamin D 27 IU dan kalsium 32,4 mg.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah dosis susu sapi bubuk sebagai sumber vitamin D dan kalsium.

#### 4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah jumlah sel busa (*foam cell*) pada lapisan intima aorta tikus.

#### 4.3.3 Variabel Terkendali

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar objek penelitian selalu terkontrol dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini, yaitu : jenis tikus, umur

tikus, jenis kelamin tikus, berat badan awal, pemberian diet, kondisi lingkungan kandang, dan pemberian per oral susu formula bubuk.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 4.4.1 Lokasi Penelitian

1. Perawatan tikus dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya.
2. Pembuatan preparat histopatologi dan analisa jumlah sel busa (*foam cell*) dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

##### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan kurang lebih 150 hari mulai September 2013 sampai dengan Februari 2014.

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.5.1 Alat Penelitian

1. Alat untuk pemeliharaan binatang coba, yaitu bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang soliter berukuran 36,5 cm x 28 cm x 15,5 cm, botol air untuk minum binatang coba, rak tempat menaruh kandang, tempat makanan (*pellet*), sekam, dan timbangan torbal (*torsion balance*) dengan ketelitian 1 angka di belakang koma untuk menimbang berat badan tikus dengan satuan gram.
2. Alat untuk pembuatan pakan tikus, yaitu baskom plastik, timbangan, neraca analitik, sarung tangan plastik, nampan, dan gelas ukur.

3. Alat untuk pembuatan larutan streptozotocin adalah *vortex*.
4. Alat untuk injeksi larutan streptozotocin adalah spuit.
5. Alat untuk pengukuran glukosa darah tikus adalah jarum, serbet, dan alat pengukur glukosa digital.
6. Alat untuk pengambilan sampel (aorta), yaitu seperangkat alat bedah seperti gunting bedah (lurus panjang, lurus pendek dan bengkok), pinset, cawan petri, beker glass, kertas saring dan kapas, toples untuk pembiusan hewan coba, tabung film, dan formalin.
7. Alat-alat untuk pembuatan sediaan histologi, yaitu mikrotom potong beku, kaca obyek, kaca penutup, *staining jar*, mikrotom, *incubator* suhu 56 °C, gelas beker, pinset dan blok paraffin.
8. Alat untuk analisa jumlah foam cell pada lapisan intima aorta, yaitu mikrometer dan mikroskop cahaya.

#### 4.5.2 Bahan Penelitian

##### 4.5.2.1 Bahan Pakan Tikus

1. Diet normal

Pakan normal yang terdiri dari *comfeed* PARS 53% (dengan kandungan protein 11 %, lemak 4 %) dan tepung terigu 23,5 %, dan air 23,5 %.

2. *High Fat Diet*

*High Fat Diet* diberikan 40 gram setiap hari per tikus. Komposisi High Fat Diet adalah sebagai berikut :

Tabel 4.1 Komposisi *High Fat Diet*

Bahan	Persentase (%)	Berat (Gram)
Comfeed PARS	50	20 gram
Tepung terigu	25	10 gram
Kuning telur bebek	5	2 gram
Lemak kambing	10	4 gram
Minyak kelapa	1	0.4 gram
Minyak babi	8.9	3.55 gram
Asam kolat	0.1	0.05 gram
TOTAL	100	40 gram

### 3. Susu sapi bubuk

Susu sapi bubuk yang digunakan merupakan susu sapi bubuk dengan kandungan vitamin D yang tinggi dan memiliki rasio kandungan yang mendekati anjuran optimal untuk menurunkan resiko diabetes mellitus tipe 2. Susu sapi bubuk yang digunakan adalah susu bubuk komersial dengan kandungan vitamin D sebesar 400 IU dan kalsium sebesar 500 mg dalam setiap sajian 40 gram susu bubuk. Pemberian susu sapi bubuk akan dicampurkan kedalam pakan tikus. Berikut perhitungan dosis susu sapi bubuk :

Rata-rata berat badan manusia dewasa = 70 kg = 70.000 gram

Rata-rata berat badan tikus = 0,2 kg = 200 gram

1. Kebutuhan vitamin D yang esensial untuk DM menurut Nikooyeh (2011) adalah sebesar 1000 IU, dimana diketahui 1 IU = 0,025 mcg dan 1 mcg = 40 IU (Mahan, 2008).
2. Kebutuhan kalsium yang esensial untuk DM adalah sebesar >1200 mg (Pittas, 2006).

- Berdasarkan tabel konversi dosis, diketahui indeks konversi dosis dari manusia (dengan berat badan 70 kg) ke tikus (dengan berat badan 200 gram) adalah sebesar 0,018 kali dosis pada manusia (Harmita, 2008), maka diperoleh kebutuhan masing-masing vitamin D dan kalsium untuk tikus adalah:

Kebutuhan vitamin D optimal tikus =  $1000 \text{ IU/hari} \times 0,018 = 18 \text{ IU/hari}$

Kebutuhan kalsium optimal tikus =  $1200 \text{ mg/hari} \times 0,018 = 21,6 \text{ mg/hari}$

- Perbandingan kebutuhan vitamin D dan kalsium dengan menggunakan deret hitung.

**Tabel 4.2 Perbandingan Kebutuhan Vitamin D dan Kalsium Pada Manusia dengan Menggunakan Deret Hitung**

	P1	P2	P3
<b>Vitamin D (IU)</b>	500	1000	1500
<b>Kalsium (mg)</b>	600	1200	1800

Dari tabel di atas, kemudian dikonversikan ke dalam kebutuhan tikus seperti pada tabel 4.3 berikut.

**Tabel 4.3 Konversi Dosis Vitamin D dan Kalsium pada Manusia ke Tikus**

	P1	P2	P3
<b>Vitamin D (IU)</b>	9	18	27
<b>Kalsium (mg)</b>	10,8	21,6	32,4

- Dalam 40 gram (satu sajian) susu sapi bubuk komersial yang digunakan mengandung 400 IU vitamin D dan 500 mg Ca,

sehingga perhitungan susu sapi bubuk yang akan diberikan adalah:

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{kebutuhan VTD tikus}}{\text{kandungan VTD dalam susu sapi bubuk}} \times 40\text{g} \\ &= \frac{18}{400} \times 40\text{g} \\ &= 1,8 \text{ g} \end{aligned}$$

6. Pemberian susu sapi bubuk yang optimal (dengan kandungan vitamin D dan kalsium yang optimal) adalah sebesar 1,8 gram. Dengan begitu maka pemberian susu sapi bubuk berturut-turut dari perlakuan (P)1 hingga perlakuan (P)3 adalah 0,9 gram; 1,8 gram; dan 2,7 gram. Pada manusia Upper Level (UL) vitamin D adalah 2000 IU dan kalsium 2500 mg. sehingga bila dikonversi ke tikus UL vitamin D 36 IU dan kalsium 45 gram.

#### 4. Larutan STZ

Streptozotocin (STZ) 100 gram dilarutkan 3ml buffer sitrat dengan pH 4,5.

#### 4.5.2.2 Bahan Pembuatan Preparat Histopatologi Jaringan Aorta Tikus

Bahan yang digunakan untuk pemeriksaan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Chloroform* (obat bius)
- Bahan untuk pembuatan preparat histopatologi jaringan aorta tikus dengan metode pewarnaan Hematoksilin-Eosin yaitu: larutan *buffered neutral formalin* 10%, alkohol dengan konsentrasi bertingkat (70%, 80%, 90% dan alkohol absolut), xylol, pewarna utama Harris Hematoksilin, pewarna Eosin, amonia air, parafin (*histoplast*), dan Entelan.

#### 4.6 Definisi Operasional

Berikut adalah definisi operasional dari variabel-variabel yang akan diteliti.

Variabel	Keterangan	Indikator	Jenis Data
<b>High Fat Diet (HFD)</b>	Jenis pakan yang diberikan pada tikus percobaan dengan kandungan lemak lebih tinggi dibandingkan pakan normal selama 4 minggu sebelum tikus diinduksi STZ. Pemberian pakan <i>HFD</i> adalah 40 gram/tikus/hari.	Tambahan lemak 24,9% dari pakan normal baik dari sumber lemak nabati dan hewani.	Rasio
<b>Tikus Model Diabetik Induksi Streptozotocin (STZ)</b>	Objek percobaan yang diberikan prosedur perlakuan MLD-STZ dosis 40 mg/kgBB. Diberikan sesudah pemberian <i>HFD</i> pada tikus selama 4 minggu (hari ke-36).	Kadar glukosa darah yang mencapai $\geq 200$ mg/dL selama dua hari berturut-turut.	Nominal
<b>Susu Sapi Bubuk</b>	Bahan makanan rendah lemak, tinggi vitamin D dan kalsium yang digunakan sebagai intervensi pada objek penelitian dengan <i>post-test only controlled group design</i> dosis berbeda tiap perlakuan, perlakuan 1 (P1) diberikan 0,9 g, perlakuan 2 (P2) diberikan 1,8 g, dan perlakuan 3 (P3) diberikan 2,7 g per tikus per hari.	Kandungan lemak rendah 2,5 gram, kalsium tinggi 500 mg, dan vitamin D tinggi 400 IU.	Rasio
<b>Jumlah Foam Cell</b>	Sel makrofag yang berbentuk seperti vakuola dan berisi kompleks lipid yang terlihat pada bagian dinding aorta serta nampak transparan dengan inti berwarna ungu pada bagian tunika intima.	Hasil analisa jumlah <i>foam cell</i> lapisan intima aorta pada penampang melintang yang diberi prosedur pewarnaan HE. Pembacaan preparat dilakukan dengan <i>Dot-Scan</i> dan program <i>OlyVIA</i> di empat zona lapang pandang dengan pembesaran 400 kali.	Interval

## 4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

### 4.7.1 Perlakuan pada Tikus Percobaan

1. Awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi dengan Rancangan Acak Lengkap agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.
2. Tikus dilakukan masa adaptasi selama 7 hari sebelum perlakuan. Pada masa adaptasi tikus diberi pakan normal dan minuman secara *ad libitum* dan ditimbang berat badannya sebelum dan setelah adaptasi untuk memastikan berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi baik.
3. Tikus putih dibagi menjadi lima kelompok berdasarkan teknik randomisasi *Simple Random Sampling* yaitu:
  1. Kelompok kontrol negatif yang tidak diinduksi oleh STZ + Pakan normal.
  2. Kelompok kontrol positif yang diinduksi oleh STZ + *High fat diet* namun tanpa pemberian susu sapi bubuk.
  3. Kelompok perlakuan 1 yang diinduksi oleh STZ + *high fat diet* dan diberikan susu bubuk dengan kandungan vitamin D sebesar 9 IU dan kalsium sebesar 10,8 mg (susu sapi bubuk 0,9 gram).
  4. Kelompok perlakuan 2 yang diinduksi oleh STZ + *high fat diet* dan diberikan susu bubuk dengan kandungan vitamin D sebesar 18 IU dan kalsium sebesar 21,6 mg (susu sapi bubuk 1,8 gram).
  5. Kelompok perlakuan 3 yang diinduksi oleh STZ + *high fat diet* dan diberikan susu bubuk dengan kandungan vitamin D sebesar 27 IU dan kalsium sebesar 32,4 mg (susu sapi bubuk 2,7 gram).

Adanya kelompok kontrol negatif untuk memastikan bahwa akan terjadi perubahan jumlah *foam cell* setelah diberi induksi STZ

4. Tikus diberi diet tinggi lemak terlebih dahulu selama 4 minggu, kemudian dilanjutkan diet normal selama 8 minggu dengan diberi terapi susu sapi bubuk sesuai dengan kelompok perlakuan. Semua diet dan minuman diberikan secara *ad libitum*.
5. Dilakukan penimbangan sisa makanan pada tiap tikus tiap kelompok perlakuan setiap hari dan penimbangan berat badan tikus setiap minggu. Sedangkan pergantian sekam 2 kali setiap 1 minggu.
6. Pada akhir percobaan dilakukan perhitungan atau jumlah *foam cell* seluruh tikus percobaan.

#### 4.7.2 Pembuatan Pakan Standar

Proses pembuatan pakan diet normal tikus dengan cara sebagai berikut: (1) menimbang bahan (PARS dan terigu), (2) mencampur bahan, menambahkan air secukupnya dan diaduk rata, dan (3) membentuk pakan bulatan dan ditimbang 40 gram untuk per tikus per hari. Proses pembuatan diet normal dan susu dengan cara sebagai berikut : (1) menimbang bahan (PARS dan terigu), (2) mencampur bahan, menambahkan air secukupnya dan diaduk rata, (3) membentuk pakan bulatan dan ditimbang 40 gram untuk per tikus per hari, (4) susu ditimbang untuk satu per satu pakan, (5) kurangkan pakan normal agar isokalorik (Perlakuan 1 dikurangi 1,37 gram, perlakuan 2 dikurangi 2,74 gram, perlakuan 3 dikurangi 4,12 gram), (6) campurkan susu dalam bulatan pakan yang telah dihancurkan, dan (7) bentuk bulatan kembali.

### 4.7.3 Proses Perlakuan Tikus Wistar Agar Menjadi Diabetes Melitus Tipe II

#### 4.7.3.1 Pemberian Pakan Tinggi Lemak (*High Fat Diet*)

Proses pembuatan pakan HFD tikus dengan cara sebagai berikut : (1) Menimbang bahan (PARS, terigu, kuning telur bebek, lemak kambing, minyak kelapa, minyak babi, asam kolat), (2) mencampur bahan, diaduk rata dan ditimbang 40 gram untuk per tikus per hari, dan (3) pakan ditambahkan air hingga dapat dibentuk bulatan.

#### 4.7.5.2 Proses Pembuatan Larutan STZ

1. Streptozotocin (STZ) 100 gram dilarutkan dalam 3 ml buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5
2. Larutan divortex hingga homogen
3. Larutan STZ disimpan pada suhu 4°C

#### 4.7.5.3 Induksi Larutan STZ pada Tikus Wistar

1. Berat badan tikus ditimbang.
2. Larutan STZ 40 ml/kgBB diinjeksikan secara intraperitoneal (IP) sampai tikus memiliki kadar gula darah >200 mg/dL selama 2 hari berturut-turut
3. Tikus diposisikan menghadap kearah frontal hingga terlihat bagian abdomennya
4. Pada bagian atas abdomen tikus disemprotkan alkohol 70%, kulit dicubit hingga terasa bagian ototnya
5. Spuit dimasukkan pada bagian abdomen dan dicoba digerakkan, apabila terasa berat maka sudah masuk pada daerah intraperitoneal.

6. Segera STZ diinjeksi secara perlahan, selanjutnya abdomen tikus disemprot dengan etanol 70 % kembali.
7. Setelah injeksi STZ, diukur kadar glukosa darah sewaktu. Tikus dinyatakan positif DM jika kadar glukosa darah  $\geq 200$  mg/dL selama dua hari berturut-turut.

#### 4.7.4 Pemeriksaan Glukosa Darah Tikus

1. Tikus dipegang.
2. Ujung ekor diberi alkohol dan ditusuk jarum.
3. Ekor diurut ke distal sehingga darah keluar melalui ujung luka.
4. Darah ditempelkan di stik yang ditempelkan pada alat ukur digital, kemudian dilihat hasilnya.

#### 4.7.5 Prosedur Pengambilan Aorta Tikus

Sampel pembuluh darah aorta tikus diambil pada akhir percobaan dengan pembedahan hewan coba setelah pembiusan dengan *chloroform*. Bagian abdomen hewan coba dibuka kemudian diambil aorta dari jantung, lalu jaringan aorta dicuci dengan aquades dan segera dimasukkan ke tempat organ berisi formalin sampai tenggelam. Setelah itu, dibuat preparat dengan teknik embedding dan dilakukan pengecatan.

#### 4.7.6 Prosedur Pembuatan Slide Preparat Histopatologi Aorta Tikus

1. Proses Pemotongan Jaringan Berupa Makross
  - Gross hasil bedah dimasukkan ke larutan formalin buffer 10% (fiksasi) semalam.

- Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan diteliti.
- Jaringan dipotong kurang lebih ketebalan 2-3 milimeter.
- Dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti.
- Dimasukkan ke dalam larutan formalin 10% sebelum diproses/dimasukkan ke alat *Automatic Tissue Tex Processor*.
- Diproses menggunakan alat atau mesin *Automatic Tissue Tex Processor* selama 90 menit.
- Alarm bunyi tanda selesai.

## 2. Proses Pengeblokan dan Pematangan Jaringan

- Jaringan diangkat dari mesin *Automatic Tissue Tex Processor*.
- Jaringan diblok dengan parafin sesuai dengan kode jaringan.
- Jaringan dipotong dengan alat mikrotom dengan ketebalan 3 – 5 mikron.

## 3. Proses Deparafinisasi

Setelah disayat atau dipotong dengan ketebalan 3-5 mikron, diletakkan ke dalam oven selama 30 menit dengan suhu 70° – 80° C, kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing selama 20 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam 4 tabung alkohol yaitu 70%, 80%, 90% dan absolut masing-masing selama 3 menit (proses hidrasi), dan yang terakhir dimasukkan ke dalam air biasa selama 15 menit.

## 4. Proses Pewarnaan Hematoksilin-Eosin atau *Auto Staining*

- Cat utama Harris Hematoksilin selama 10 – 15 menit
- Cuci dengan air mengalir selama 15 menit

- Alkohol asam 1 % 2 – 5 Celup
  - Amonia air 3 – 5 Celup
  - Cat pembanding :  
Eosin 1% selama 10 – 15 Menit
5. Proses Dehidrasi
- Alkohol 70% 3 menit
  - Alkohol 80% 3 menit
  - Alkohol 96% 3 menit
  - Alkohol Absolut 3 menit
6. Proses penjernihan (*clearing*) dengan larutan xylol selama 2 x 60 menit.
7. Proses *Mounting* dengan Entelan dan *Coverglass*.
- Membiarkan slide kering pada suhu ruangan.
  - Setelah kering, slide siap untuk diamati.

#### 4.7.7 Cara Analisa Jumlah *Foam Cell* pada Lapisan Intima Aorta Tikus

1. Analisa jumlah *foam cell* dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Pembacaan preparat dilakukan pada lapisan intima aorta tikus dengan *Dot-Scan* dan program *OlyVIA* pada empat zona lapangan pandang dengan satuan ukuran mikron.
2. Perhitungan jumlah infiltrasi *foam cell* pada lapisan intima aorta dilakukan oleh peneliti dengan dibantu staf laboratorium Patologi Anatomi.
3. Jumlah *foam cell* untuk setiap preparat merupakan rata-rata dari pengulangan setiap lapang pandang.

#### 4.8 Pengumpulan Data

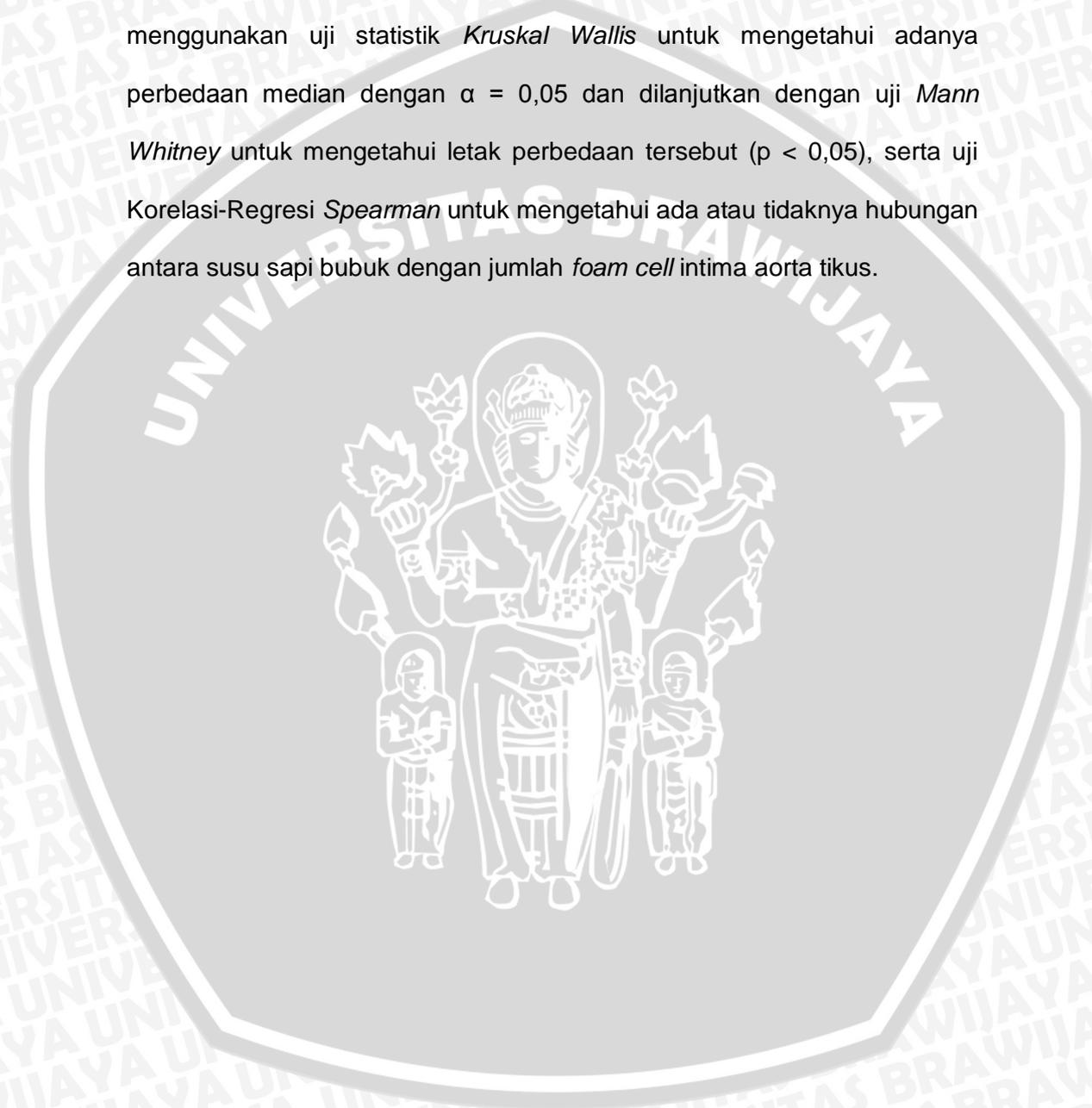
1. BB tikus ditimbang setiap seminggu sekali.
2. Data asupan makan diperoleh dengan penimbangan berat makanan sebelum dan sesudah pemberian, 1x sehari selama penelitian
3. Data rata-rata asupan makanan diperoleh melalui pembagian jumlah keseluruhan asupan dengan jumlah tikus coba untuk masing-masing kelompok perlakuan dan ditabulasikan ke dalam bentuk tabel.
4. Data rata-rata jumlah *foam cell* aorta tikus di peroleh melalui pembagian jumlah keseluruhan jumlah *foam cell* aorta dengan jumlah tikus coba untuk masing-masing kelompok perlakuan dan ditabulasikan ke dalam bentuk tabel.

#### 4.9. Analisis Data

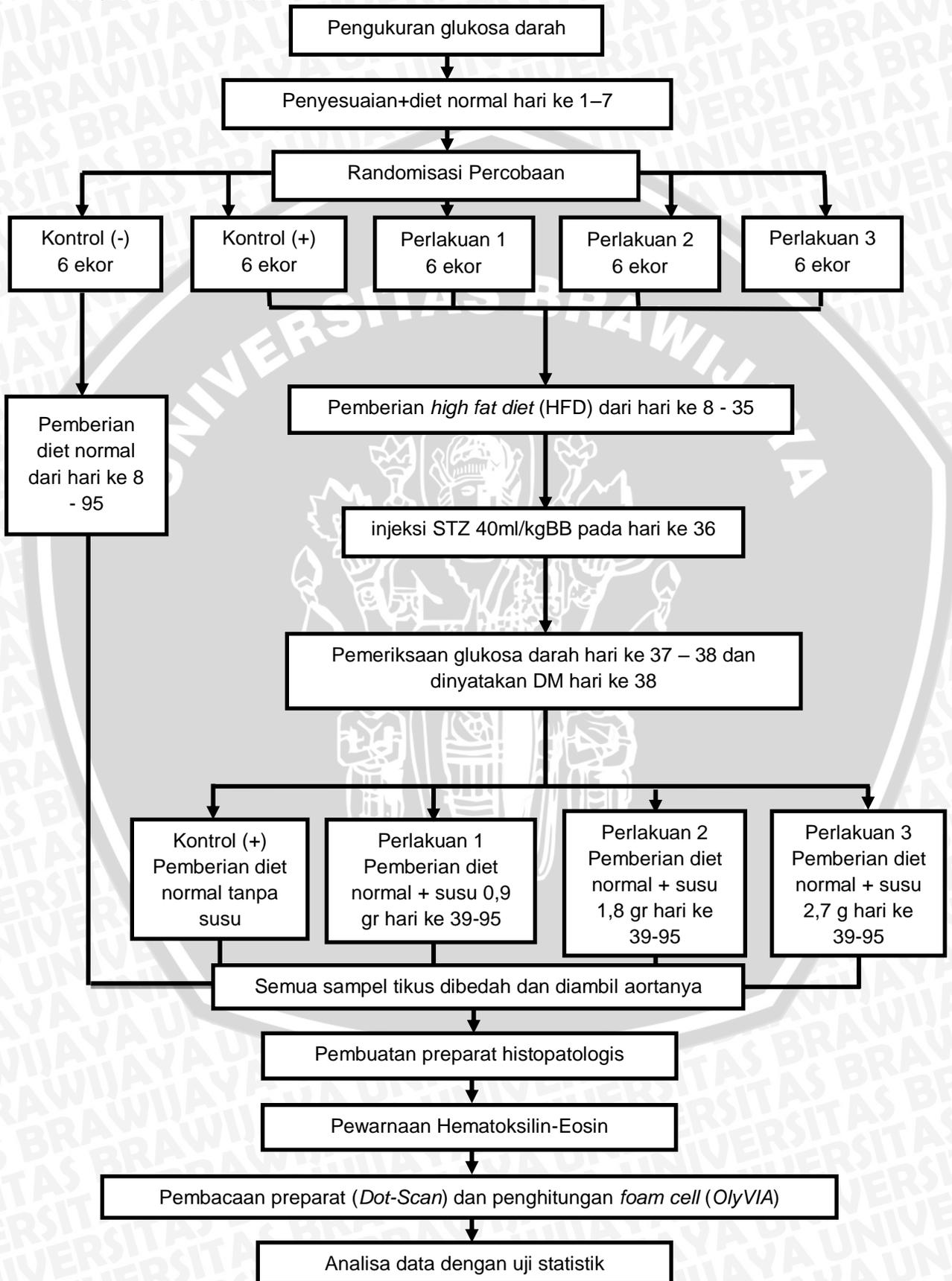
Data yang didapat dianalisis dengan program SPSS 16. Data yang didapatkan pertama kali dilakukan uji normalitas, untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak, karena pemilihan penyajian dan uji hipotesis tergantung dari hasil uji normalitas. Kemudian seluruh data diuji dengan *test of homogeneity of variances* untuk mengetahui bahwa semua data homogen. Kemudian dilanjutkan uji *one-way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan jumlah *foam cell* antar kelompok. Uji ANOVA mensyaratkan data harus berdistribusi normal dan varian homogen. Jika terdapat perbedaan maka dapat dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok. Uji statistik dilakukan dilakukan pada tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ), perbedaan dikatakan bermakna jika  $p < 0,05$ . Selanjutnya, untuk mengetahui ada atau

tidaknya hubungan antara susu sapi bubuk dengan jumlah *foam cell* intima aorta tikus dapat dilakukan uji Korelasi-Regresi *Pearson*.

Jika data tidak homogen dan atau tidak berdistribusi normal maka menggunakan uji statistik *Kruskal Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan median dengan  $\alpha = 0,05$  dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui letak perbedaan tersebut ( $p < 0,05$ ), serta uji Korelasi-Regresi *Spearman* untuk mengetahui ada atau tidaknya hubungan antara susu sapi bubuk dengan jumlah *foam cell* intima aorta tikus.



4.10 Alur Penelitian



Gambar 5.1 Diagram Alur Penelitian

