

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) dengan menggunakan rancangan *randomize post test only control group design*.

4.2 Sampel

4.2.1 Pemilihan Sampel

Sampel penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus Norvegicus Galur Wistar*. Jenis kelamin tikus yang digunakan adalah tikus jantan yang sehat karena tikus betina terdapat estrogen yang mempengaruhi metabolisme lemak dan kolesterol. Tikus diperoleh dari Laboratorium Anatomi Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang kemudian dipelihara di Laboratorium Anatomi Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Kriteria inklusi untuk dijadikan sampel adalah sebagai berikut :

1. Tikus *Rattus Norvegicus Galur Wistar* Jantan
2. Tikus dengan bulu rata berwarna putih, sehat, mata jernih, bergerak aktif, dan tingkah laku normal
3. Umur 6-8 minggu
4. Berat rata-rata 150 gram

4.2.2 Jumlah Sampel

Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel menggunakan rumus hullely (Notoadmojo, 2010) adalah sebagai berikut :



$$P(n-1) = 15$$

p : jumlah perlakuan , n: jumlah pengulangan

pada penelitian ini p = 5 sehingga jumlah pengulangan adalah :

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

$$5n-5 = 15$$

$$n = 4$$

Untuk setiap perlakuan diberikan penambahan 1 kali pengulangan sebagai cadangan sehingga total sampel yang dibutuhkan sejumlah 25 ekor tikus dengan rincian 5 ekor atau 5 pengulangan. Sebelum pengelompokan dilakukan aklimatisasi selama 2 minggu.

Penelitian ini membagi sampel dalam 5 kelompok perlakuan, yaitu :

1. Kelompok kontrol negatif ; kelompok dengan diet normal tanpa diberikan susu kedelai (P0).
2. Kelompok kontrol positif ; kelompok dengan diet tinggi lemak tanpa diberi susu kedelai (P1).
3. Kelompok kontrol D1 ; kelompok dengan diet tinggi lemak yang diberi susu kedelai 0,81 gram/ml/tikus/hari dalam 3 ml aquadest.
4. Kelompok kontrol D2 ; kelompok dengan diet tinggi lemak yang diberi susu kedelai 1,62 gram/ml/tikus/hari dalam 3 ml aquadest.
5. Kelompok kontrol D3 ; kelompok dengan diet tinggi lemak yang diberi susu kedelai 3,24 gram/ml/tikus/hari dalam 3 ml aquadest.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung

Variabel terkait dalam penelitian ini adalah jumlah *vasa vasorum* pada aorta tikus *Rattus Norvegicus Galur wistar*.

4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian susu kedelai. Dosis yang diberikan 0,81 gram/ml/tikus/hari dalam 3 ml aquadest, kedelai 1,62 gram/ml/tikus/hari dalam 3 ml aquadest, dan 3,24 gram/ml/tikus/hari dalam 3 ml aquadest.

4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar obyek penelitian selalu terkontrol dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah :

- Jenis tikus
- Umur tikus
- Jenis kelamin tikus
- Berat badan tikus
- Pemberian diet tinggi lemak
- Kondisi lingkungan kandang

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi pemeliharaan dan pembedahan hewan coba adalah Laboratorium Fisiologi Molekuler Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pewarnaan preparat jaringan aorta dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penghitungan jumlah vasa vasorum dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilakukan dalam jangka 90 hari pada bulan Agustus – November 2014.



4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

- Alat untuk pemeliharaan tikus : Bak plastik berukuran 45 cm x 35.5 cm x 14.5 cm, dengan tutup kandang terbuat dari kawat, botol air, sekam, dan timbangan berat badan dengan neraca sartorius.
- Alat pembuatan pakan tikus : alat pembuatan, timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, wadah untuk mencampur adonan pakan dan nampan.
- Alat untuk pemberian susu kedelai : gelas ukur, timbangan, corong gelas, kertas saring, evaporator, labu penampung, *water pump*, *water back*, dan *vacum pump*, sonde ukuran 0,8 ml.
- Alat untuk membunuh tikus : stoples berisi *klorofom*, gunting dan pisau bedah.
- Alat untuk pengambilan dan penyimpanan jaringan : pisau bedah, gunting, botol film.
- Alat untuk pembuatan slide jaringan aorta : *slide glass*, *cover glass*,
- Alat untuk pengamatan jumlah *Vasa vasorum*: mikroskop cahaya (*Olympus*) dengan pembesaran 400x.

4.5.2 Bahan

- Pakan diet normal : *confeed* PAR-S, tepung terigu, air.
- Pakan diet atherogenik : *confeed* PAR-S, tepung terigu, kolesterol, asam kolat, minyak babi, kuning telur bebek, lemak kambing dan minyak kelapa
- Susu kedelai : kedelai bubuk, air.
- Bahan untuk membunuh tikus : kloroform.
- Bahan untuk fiksasi jaringan : formalin 10%



- Bahan pembuatan slide : jaringan (preparat) aorta tikus *Ratus Norvegicus galur Wistar*, parafin, alkohol absolut, alkohol 90%, alkohol 80%, xylol, entellan, acid alkohol 1 %, HCL 0,6%.
- Bahan pengamatan *Vasa vasorum* : Histopatologi dengan pewarnaan *Hematoxyllin dan Eosin*.

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala
Diet tinggi lemak	adalah pakan dengan kadar lemak tinggi yang diberikan setiap hari. Energy dari lemak diperoleh dari <i>confeed</i> PAR-S, tepung terigu merk “Cap Segitiga Biru”, colesterol, minyak babi, asam kolat , kuning telur bebek, lemak kambing, minyak kelapa dan air (Murwani, 2006)	Rasio
Susu kedelai	adalah hasil pengenceran bubuk kedelai murni merk “Mutiarra” dengan air (aquades) sesuai dengan dosis. Dosis susu kedelai 0,81 gram/tikus/hari dalam 3 ml aquadest (dosis I) , 1,62 gram/tikus/hari dalam 3 ml aquadest (dosis II) , dan 3,24 gram/tikus/hari dalam 3 ml aquadest (dosis III). (Prihandini, 2006).	Rasio
Jumlah <i>Vasa Vasorum</i>	adalah rerata banyaknya jumlah <i>vasa vasorum</i> yang diidentifikasi dari dinding aorta yang diamati dari pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan <i>Hematoxyllin dan Eosin</i> yang diamati pada mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Jumlah dari <i>vasa vasorum</i> tersebut diidentifikasi dari karakteristik lumen aorta yang berisi eritrosit (Wihastuti,2014).	Rasio

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Diet Normal

Pembuatan diet normal dilakukan setiap hari dengan ketentuan total energy 105 kalori. Komposisinya adalah sebagai berikut (Muwarni, 2006):

Tabel 4.2 Komposisi Diet Normal tikus

Komposisi	%	Jumlah
PARS	53%	21,2 gram
Terigu	23,5%	9,4 gram
Air	23,5%	9,4 ml

Tabel 4.3 Komposisi Bahan dan Energi Pakan Diet Normal Tikus

	PARS (21,2 gram)	Tepung Terigu "Segitiga Biru" (9,4 gram)	Total diet normal(PARS+ TepungTerigu)
Energi	$(21,2:100) \times 344 = 72,93$ kkal	$(9,4:100) \times 340 = 31,96$ kkal	104,9 kalori
Protein	$(21,2:100) \times 19 = 4,03$ gram	$(9,4:100) \times 11 = 1,03$ gram	5,06 gram
Lemak	$(21,2:100) \times 4 = 0,85$ gram	$(9,4:100) \times 0,9 = 0,08$ gram	0,93 gram
Karbohidrat	$(21,2:100) \times 58 = 12,29$ gram	$(9,4:100) \times 72 = 6,77$ gram	72,68 gram

Jumlah energi dalam 1 gram pakan : $104,9 \text{ kkal} : 40 \text{ gram} = 2,62$

Kebutuhan energi tikus perhari : 105 kkal / hari

Jumlah pakan tikus perhari : $105 \text{ kkal} : 2,62 \text{ kal} = 40 \text{ gram}$

Bahan disiapkan dan ditimbang sesuai dengan komposisi dan jumlah, kemudian dicampur, ditambahkan air secukupnya dan diaduk rata. Pakan diberikan sebanyak 40 gram untuk tiap ekor tikus.

4.7.2 Pembuatan Diet Tinggi Lemak

Pembuatan pakan dilakukan setiap hari, energi dari lemak diperoleh dari tepung, Kuning telur bebek, minyak kambing, minyak kelapa, asam kolat, dan minyak babi dengan komposisi sebagai berikut (Muwarni, 2006).

Tabel 4.4 Komposisi pakan tikus diet tinggi lemak

Bahan	%	Berat (gram)
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

Tabel 4.5 Bahan dan Energi Pakan Diet Tinggi Lemak Tikus

PARS 20 gram	Tepung terigu "segitiga biru" 10 gram	Kuning telur bebek 2 gram	Lemak kambi ng 4 gram	Minyak kelapa 0,4 gram	Minyak babi 3,55 gram	Asam kolat 0,05 gram
Energi = $(20:100) \times 344$ =68,8 kkal	Energi = $(10:100) \times 340$ =34 kkal	Energi = $(2:100) \times 398$ =7,96 kkal	Lemak kambing = $4 \times 9 = 36$ kkal Minyak kelapa = $0,4 \times 9 = 3,6$ kkal			
Protein = $(20:100) \times 19$ =3,8 gram	Protein = $(10:100) \times 11$ =1,1 gram	Protein = $(2:100) \times 17$ =0,34 gram	Minyak babi = $3,55 \times 9 = 31,95$ Asam kolat = $0,05 \times 9 = 0,45$ kkal			
Lemak = $(20:100) \times 4$ =0,8 gram	Lemak = $(10:100) \times 0,9$ =0,09 gram	Lemak = $(2:100) \times 35$ =0,7 gram				
Karbohidrat = $(20:100) \times 58$ = 11,6 gram	Karbohidrat = $(10:100) \times 72$ =7,2 gram	Karbohidrat = $(2:100) \times 0,8$ =0,016 gram				

$$\begin{aligned}\text{Energi} &= 68,8 + 34 + 7,96 + 36 + 31,95 + 0,45 \\ &= 182,76 \text{ kkal}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Protein} &= 3,8 + 1,1 + 0,34 = 5,24 \\ &= 20,96 \text{ kkal} = 11,5 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Lemak} &= 0,8 + 0,09 + 0,7 \\ &= 1,59 \\ &= 14,31 \text{ kkal} = 7,8 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Karbohidrat} &= 11,6 + 7,2 + 0,016 \\ &= 18,816 \text{ g} \\ &= 75,26 \text{ kkal} = 41,2 \%\end{aligned}$$

$$\text{Jumlah Energi dalam 1 gram pakan} = 182,76 \text{ kkal} : 40 \text{ gram} = 4,57 \text{ kkal}$$

$$\text{Jumlah pakan tikus per ekor} = 30 \text{ gram} / \text{hari}$$

$$\text{Dengan total kalori} = 4,57 \times 30 = 137 \text{ kkal} / \text{hari}$$

Bahan yang disiapkan dan ditimbang sesuai dengan komposisi dan jumlah kemudian dicampur, ditambah air secukupnya dan diaduk rata. Pakan diberikan sebanyak 30 gram untuk tiap ekor tikus.

4.7.3 Pembuatan Susu Kedelai

Pembuatan susu kedelai dengan melarutkan kedelai bubuk yang dilarutkan dalam aquades sesuai dengan dosis yang telah ditentukan, dengan penghitungan sebagai berikut:

- a. Perhitungan dosis susu kedelai D1

Dosis pada manusia 45 gram/hari

$$\begin{aligned}\text{Perhitungan: D1} &= 45 \text{ gram} \times 0,018 = 0,81 \text{ gram/tikus/hari dalam 3 ml} \\ &\text{aquadest}\end{aligned}$$

$$= 0,27 \text{ gram/ml/tikus/hari}$$

$$= 27 \text{ gram/100ml/tikus/hari}$$

$$= 27\%$$

b. Perhitungan dosis susu kedelai D2

Dosis pada manusia 90 gram/hari

Perhitungan: $D1 = 90 \text{ gram} \times 0,018 = 1,62 \text{ gram/tikus/hari}$ dalam 3 ml

aquadest

$$= 0,54 \text{ gram/ml/tikus/hari}$$

$$= 54 \text{ gram/100ml/tikus/hari}$$

$$= 54\%$$

c. Perhitungan dosis susu kedelai D3

Dosis pada manusia 180 gram/hari

Perhitungan: $D1 = 180 \text{ gram} \times 0,018 = 3,24 \text{ gram/tikus/hari}$ dalam 3 ml

aquadest

$$= 1,08 \text{ gram/ml/tikus/hari}$$

$$= 108 \text{ gram/100ml/tikus/hari}$$

$$= 108\% \quad (\text{Prihandini, 2006})$$

4.7.4 Perlakuan Terhadap Tikus

1. Hewan coba tikus jantan sesuai kriteria inklusi sebanyak 25 ekor tikus, dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan metode rancangan acak lengkap, dengan 5 ekor tikus pada masing-masing kelompok.
2. Tikus diletakkan dalam kandang terpisah (1 ekor perkandang).
3. Sebelum perlakuan, tikus diaklimatisasi dengan kondisi laboratorium selama 14 hari, dengan tujuan untuk menyesuaikan dengan lingkungan.
4. Selama aklimatisasi, tikus sampel diberi diet standard (diet normal) dan minuman yang diberikan secara *ad libitum*.
5. Sebelum pemberian diet tinggi lemak, semua tikus ditimbang berat badannya.
6. Tikus kelompok kontrol negatif (PO) diberi diet normal.

7. Tikus kelompok perlakuan kontrol positif (P1) diberi diet tinggi lemak.
8. Semua tikus kelompok perlakuan P2,P3,P4 diberi diet tinggi lemak dan susu kedelai sesuai dosis masing-masing 0,81 gram/ml/tikus/hari dalam 3 ml aquadest, 1,62 gram/ml/tikus/hari dalam 3 ml aquadest, dan 3,24 gram/ml/tikus/hari dalam 3 ml aquadest dengan cara dimasukkan peroral 2x dalam sehari dengan sonde bersamaan dengan pemberian diet tinggi lemak.
9. Setiap hari pakan tikus yang diberikan ditimbang. Keesokan harinya sisa pakan yang ada ditimbang kembali untuk mengetahui asupan pakan.
10. Tikus ditimbang setiap seminggu sekali untuk mengetahui perkembangan berat badannya.
11. Perlakuan tikus dilakukan secara bersamaan selama 90 hari.
12. Pada akhir penelitian hari ke-91 semua tikus ditimbang berat badannya (dinyatakan sebagai berat badan akhir), kemudian dibunuh dengan kloroform dan diambil jaringan aorta dengan pembedahan untuk selanjutnya dilakukan pembuatan preparat dengan metode *Parafin section* dan pengecatan *Hematoxylin dan Eosin*.
13. Kemudian dilakukan penghitungan vasa vasorum dan dihitung reratanya.

4.7.5 Pembuatan Preparat Aorta Tikus

Untuk pembuatan preparat histopatologi dibutuhkan bahan utama berupa jaringan segar yang difiksasi dalam larutan formalin 10%. Jaringan dipotong dan diatur dalam *tissue cassetes*, di dehidrasi secara otomatis dengan mesin dehidrasi, dikeringkan dengan mesin *vaccum*, dan diblok dengan cairan parafin selanjutnya blok tersebut dipotong 3-5 mikromili dengan mesin mikrotom dan potongan tersebut dilekatkan pada kaca obyek. Setelah itu kaca obyek diwarnai secara manual dengan *Hematoxylin dan Eosin*. Pewarnaan tersebut akan memberikan keseimbangan warna biru dan merah dengan jelas pada

jaringan, sehingga komponen sel dapat diidentifikasi dengan jelas (Muntiha, 2001).

4.7.6 Tahapan Pewarnaan HE

1. *Deparafinisasi* dengan tujuan untuk menghilangkan/ melarutkan parafin yang terdapat pada jaringan. Zat yang digunakan *xylol*.
2. *Rehidrasi* dengan tujuan untuk memasukkan air ke dalam jaringan. Air akan mengisi rongga-rongga jaringan yang kosong. Zat yang digunakan alkohol absolut, alkohol 90 %, alkohol 80 % .
3. Pewarnaan pertama dengan tujuan untuk memberi warna pada inti dan sitoplasma pada jaringan .Zat yang digunakan *hematoxylin* .
4. *Differensiasi* dengan tujuan untuk mengurangi warna biru pada inti dan menghilangkan warna biru pada sitoplasma .Zat yang dipakai acid alkohol 1% (1% HCl dalam 70% alkohol) dalam waktu 5-10 detik.
5. *Blueing* dengan tujuan untuk memperjelas warna biru pada inti sel .Zat yang digunakan *alkalin solution* (seperti air amonia) diikuti 5 menit cuci dalam air kran.
6. Pewarnaan kedua dengan tujuan untuk memberi warna merah pada sitoplasma sel .Zat yang digunakan eosin 1% selama 10 menit.
7. Mencuci dalam air mengalir selama 1-5 menit.
8. *Dehidrasi* dengan tujuan untuk menghilangkan air dari jaringan .Zat yang digunakan Alkohol 80 %, Alkohol 90 %, Alkohol 100 % (absolut).
9. *Mounting* dengan tujuan untuk mengawetkan jaringan yang telah diwarnai. Zat yang digunakan *entellan / canada balsem* .



4.7.7 Pembacaan dan Penghitungan *Vasa Vasorum*

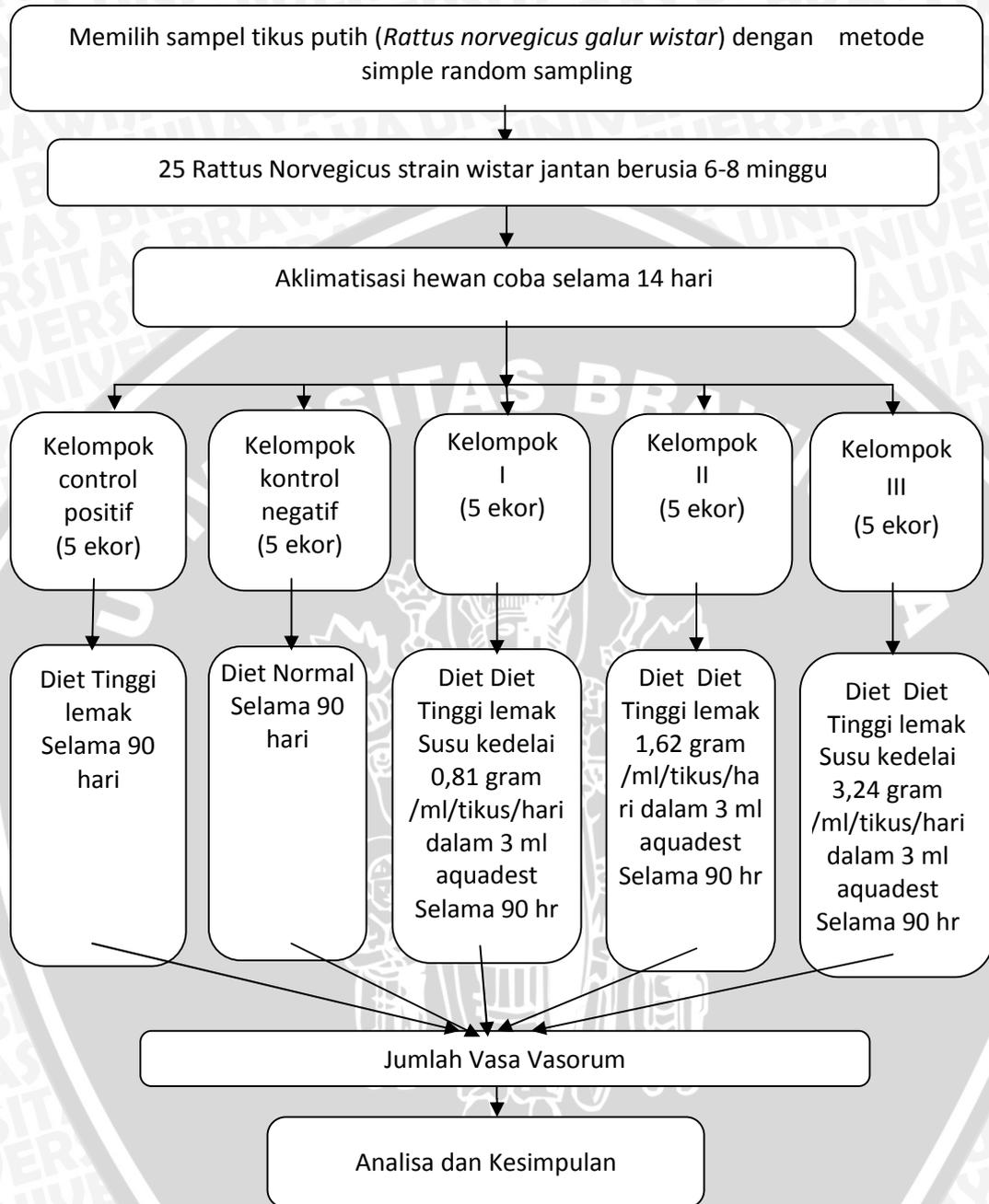
Pengamatan slide menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada aorta tikus dengan pengamatan pada satu penampang aorta dan dihitung jumlahnya. Jumlah dari vasa vasorum tersebut diidentifikasi dari karakteristik lumen aorta yang berisi eritrosit (Wihastuti,2014).

4.8 Pengolahan dan Analisa Data

Pengambilan data dan analisa data dilakukan setelah 90 hari penelitian. Analisis ditentukan terhadap pengukuran gambaran jumlah vasa vasorum pembuluh darah aorta tikus *Ratus Norvegicus galur wistar*. Untuk mengetahui perbedaan rata-rata jumlah *vasa vasorum* antar kelompok kontrol dengan perlakuan digunakan uji statistic *Oneway Anova*. Penelitian ini bermakna bila nialai $p < 0,05$ dan hipotesis yang menyatakan bahwa susu kedelai dapat menurunkan jumlah *vasa vasorum* pada aorta tikus *Ratus Norvegicus galur wistar* yang dipapar diet tinggi lemak terbukti. Namun, apabila $p > 0,05$ berarti hipotesis tersebut ditolak.

Teknik pengolahan dan analisis data dilakukan dengan menggunakan program *Software product and service solution 17 PS* (SPSS 17 PS), dengan tingkat signifikansi atau nilai *probabilitas* 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

4.9 Tahapan Penelitian



Gambar 4.1 Tahapan Penelitian