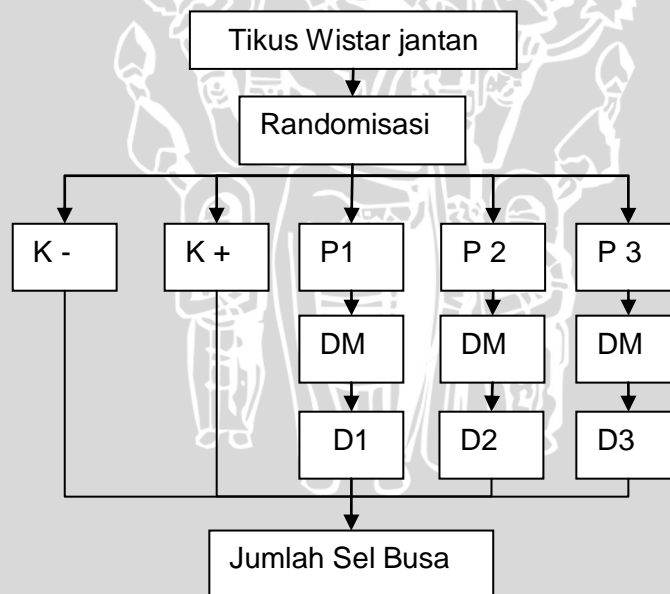


BAB IV
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental randomized posttest only controlled group* yang mana setiap unit percobaan memiliki probabilitas yang sama untuk mendapat perlakuan (Chandra, 1995). Secara skematis dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

K - : Kontrol negatif

K+ : Kontrol positif (model tikus DM tipe 2)

P1 : Perlakuan 1 (model tikus DM tipe 2 dengan bubuk kayu manis dosis I)

P2 : Perlakuan 2 (model tikus DM tipe 2 dengan bubuk kayu manis dosis II)

P3 : Perlakuan 3 (model tikus DM tipe 2 dengan bubuk kayu manis dosis III)

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah tikus putih jenis *Rattus norvegicus* strain wistar dengan kriteria sebagai berikut:

1. Kriteria Inklusi:

- a. Jenis kelamin jantan
- b. Usia 8-12 minggu
- c. Berat Badan 150-175 gram
- d. Gerakan aktif, mata jernih, bulu bersih dan baik, serta
- e. Tidak mengalami pengobatan sebelumnya

2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus tidak mau makan selama penelitian berlangsung
- b. Tikus sakit di luar intervensi
- c. Tikus mati pada saat penelitian atau
- d. Saat pembedahan ditemukan kelainan bawaan

4.2.2 Estimasi Besar Subyek Penelitian

Dalam penelitian ini ada 5 kelompok perlakuan: kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan dengan pemberian 3 macam dosis bubuk kayu manis per sonde.

Besar unit eksperimen dalam setiap perlakuan dihitung dengan rumus:

$$(t-1)(r-1) \geq 15;$$

$$(5-1)(r-1) \geq 15;$$

$$4r-4 \geq 15;$$

$$4r \geq 19;$$

$$r \geq 5$$

yangmana, t = jumlah perlakuan

r = jumlah ulangan

15 = nilai deviasi (Loekito, 1998)

Jadi jumlah sampel untuk setiap perlakuan adalah 5 ekor sehingga total sampel yang digunakan sebesar 25 ekor.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis bubuk kayu manis.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel busa.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Pemeliharaan hewan coba selama penelitian dan pengambilan aorta dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB. Pembuatan slide histo patologi

aorta dan penghitungan sel busa dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Desember 2012 sampai Februari 2013.

4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Makanan Tikus

4.5.1.1 Pakan Standard

Pakan standard diberikan sebanyak 40 gram per hari dalam bentuk ransum dengan komposisi: PARS sebanyak 21,2 g (53%), tepung terigu sebanyak 9,4 g (23,5%) dan air sebanyak 9,4 mL (23,5%). Adapun nilai gizi pakan standard ini per 100 gramnya adalah sebagai berikut:

Energi	: 104,9 Kkal
Karbohidrat	: 19,06 gram (72,7% dari energi total)
Protein	: 5,06 gram (19,3% dari energi total)
Lemak	: 0,93 gram (8% dari energi total)

4.5.1.2 Bubuk Kayu Manis

Berdasarkan penelitian Khan *et al.* (2006), dosis kayu manis sebesar 1-3 g dapat menurunkan kadar glukosa pada individu dengan diabetes sebaik dosis 6 g. Kemudian dosis yang digunakan sebagai dasar perhitungan adalah 3 g. Faktor konversi dosis dari manusia ke tikus adalah 0,018 (Sjabana, 2006). Dalam

penelitian ini digunakan 3 macam dosis kayu manis yang diperoleh dengan deret hitung ($\frac{1}{2} n$, n dan $2 n$), yaitu 1,5 g, 3 g dan 6 g.

$$\text{Dosis I} = 1,5 \text{ g} \times 0,018 = 27 \text{ mg/hari}$$

$$\text{Dosis II} = 3 \text{ g} \times 0,018 = 54 \text{ mg/hari}$$

$$\text{Dosis III} = 6 \text{ g} \times 0,018 = 108 \text{ mg/hari}$$

4.5.2 Bahan dan Instrumen Penelitian untuk Pemeliharaan Tikus Putih

Bahan dan instrumen untuk pemeliharaan tikus adalah kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, dan pakan standard tikus.

4.5.3 Bahan dan Instrumen Penelitian untuk Pemberian Bubuk Kayu Manis

Bahan dan instrumen untuk memberikan bubuk kayu manis pada tikus adalah spuit dan sonde.

4.5.4 Bahan dan Instrumen untuk Pembedahan Tikus

Bahan dan instrumen untuk pembedahan tikus terdiri dari papan wax, jarum, pinset, pinset chirurgis, gunting, scalpel, dan penyemprot alkohol.

4.5.5 Bahan dan Instrumen untuk Pembuatan Sediaan Histologi

Bahan dan instrumen untuk pembuatan sediaan histologi terdiri dari formalin 10%, mesin *Tissue Tex Processor*, parafin blok, microtome, oven (suhu 50-70°C), larutan xylol, air dan alkohol

4.5.6 Bahan dan Instrumen untuk Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)

Bahan dan instrumen untuk pewarnaan HE terdiri dari cat Harris Hematoksilin, air, alkohol asam 1%, amonia air, cat eosin, xylol, alkohol 80% dan 96%, entelan dan *deck glass*.

4.5.7 Instrumen untuk Penghitungan Sel Busa

Instrument untuk penghitungan sel busa adalah scan dot slide mikroskop.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Bubuk kayu manis: produk olahan kulit pohon kayu manis yang dibeli di Hypermart Matos dengan merk "Cassiavera Kayu Manis" hasil produksi PT Pawon Gemilang Rasa. Skala rasio. Satuan dalam mg.

4.6.2 Jumlah Sel Busa: hasil penghitungan sel busa (sel yang berbentuk seperti busa, merupakan hasil dari makrofag yang memakan LDL teroksidasi) yang berada di tunika intima sampai tunika media secara kuantitatif pada potongan melintang aorta abdominalis setebal 3-5 mikron dengan pengecatan HE. Skala rasio. Penentuan skala pengukuran dilakukan untuk menentukan analisis statistik yang akan dipakai.

4.6.3 Model DM Tipe 2: tikus wistar jantan yang memiliki kadar glukosa puasa > 200 mg/dL (diukur dengan GlucoStick) setelah diinjeksi STZ dengan dosis 55 ml/KgBB (Ramarao dan Srinivasan, 2007) dan memiliki tanda-tanda klasik diabetes (poilifagia, polidipsia dan poliuria).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

1. Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan standard, hewan uji tikus wistar, dan seleksi tikus (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan).
2. Tikus diadaptasikan di dalam laboratorium selama 5 hari.
3. Tikus dibagi dalam lima kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor yaitu (a) kelompok kontrol positif, (b) kelompok kontrol negatif: (c) kelompok perlakuan I; (d) kelompok perlakuan II; (e) kelompok perlakuan III.

4.7.2 Pembuatan Larutan Kayu Manis

Karena dosis kayu manis yang digunakan terlalu kecil maka sediaan larutan kayu manis dibuat dengan cara melarutkan bubuk kayu manis sesuai dosis dikalikan jumlah tikus dengan air untuk masing-masing tikus sebesar 2 mL ditambah ekstra 2 mL untuk larutan yang hilang selama proses penyondean. Secara singkat dapat dilihat sebagai berikut:

Dosis I : 5 x @ 27 mg kayu manis + 5 x @ 2 mL air + ekstra 2 mL = 135 mg kayu manis dalam 12 mL.

Dosis II : 5 x @ 54 mg kayu manis + 5 x @ 2 mL air + ekstra 2 mL = 270 mg kayu manis dalam 12 mL.

Dosis III : 5 x @ 108 mg kayu manis + 5 x @ 2 mL air + ekstra 2 mL = 540 mg kayu manis dalam 12 mL.

4.7.3 Pemberian Larutan Kayu Manis

Pemberian larutan kayu manis dilakukan setiap pagi pada kelompok perlakuan P1 (27 mg), P2 (54 mg) dan P3 (108 mg) per sonde melalui spuit yang pada ujungnya dipasang sonde sehingga dapat langsung masuk mulut sampai lambung tikus.

4.7.4 Pembuatan Sediaan Jaringan Aorta

Proses pengerjaan preparat histo patologi meliputi 3 proses, yaitu:

1. Proses pemotongan jaringan berupa makross
 - a. Jaringan dimasukkan ke larutan formalin 10% (fiksasi) semalam
 - b. Kemudian dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan diteliti
 - c. Dipotong lebih kurang dengan ketebalan 2-3 mm
 - d. Dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode peneliti
 - e. Dimasukkan ke larutan formalin 10% sebelum diproses
 - f. Diproses menggunakan alat *Tissue Tex Processor*
2. Proses pengeblokan dan pemotongan jaringan
 - a. Diangkat dari mesin *Tissue Tex Processor*
 - b. Diblok dengan parafin sesuai kode jaringan
 - c. Dipotong dengan alat microtom dengan ketebalan 3-5 mikron
3. Proses deparafinisasi
 - a. Jaringan yang sudah dipotong ditaruh di dalam oven selama 30 menit dengan suhu 50-70°C
 - b. Kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan xylol (masing-masing 20 menit)

- c. Lalu dimasukkan ke alkohol 3 tempat. Masing-masing tempat 3 menit, kemudian dimasukkan air mengalir selama 15 menit.

Dilanjutkan dengan pewarnaan HE yang dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Melakukan pengecatan utama Harris Hematoksilin selama 10-15 menit
2. Mencucidengan air mengalir selama 15 menit
3. Memasukkan ke dalam alkohol asam 1% 2-5 kali celup
4. Memasukkan ke dalam amonia air 3-5 kali celup
5. Melakukan pengecatan pembeding eosin 1% selama 15 menit
6. Didehidrasidengan alkohol 96%, 96% dan 80% masing-masing 3 menit
7. Penjernihan (clearing) dengan xylol selama 15 menit, diulang 2 kali
8. Mounting dengan entelan dan *deck glass*

4.7.5 Penghitungan Jumlah Sel Busa

Preparat yang sudah diwarnai dengan HE diperiksa di bawah mikroskop cahaya perbesaran 400x untuk mendapatkan gambar mikroskopis sel busa yang jelas. Perhitungan dilakukan dengan menjumlahkan hasil perhitungan sel busa pada 4 lapang pandang untuk setiap preparat.

Sel busa dengan pewarnaan HE akan nampak sebagai sel yang besar dengan inti berwarna biru dan tepi yang kosong karena lemak akan luntur/lepas dengan pewarnaan HE sehingga tampak sebagai ruangan yang kosong diantara inti dengan membran sel pada masa yang berbeda.

4.8 Prosedur Pengumpulan Data

Data dalam penelitian ini dikumpulkan dari hasil evaluasi pada kelompok tikus kontrol negatif, positif, perlakuan 1, 2 dan 3. Setelah hari ke-45 (5 hari masa adaptasi ditambah masa perlakuan 40 hari) dilakukan penghitungan jumlah sel busa kemudian mencatat hasil dari evaluasi yang telah dilakukan.

4.9 Analisis Data

Analisa data statistik menggunakan SPSS Ver 16.0. Dilakukan uji *One way ANOVA* digunakan untuk membandingkan apakah ada efek bermakna dari perlakuan yang dilakukan pada rata-rata dua atau lebih kelompok. Jika syarat uji *One way ANOVA* tidak terpenuhi maka dilakukan alternatif uji non parametrik, yaitu Kruskal-Wallis. Regresi korelasi pearson (untuk uji parametrik) atau regresi korelasi spearman (untuk uji non parametrik) digunakan untuk mengetahui *dose effect relationship*. Nilai $p < 0,05$ menunjukkan data statistik yang signifikan.