

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian true eksperimental laboratorium secara *in vivo* dengan menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dipilih secara *randomize*. Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *post test control group design*. Dengan rancangan ini memungkinkan peneliti mengukur efek perlakuan pada kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, tetapi rancangan ini tidak memungkinkan peneliti untuk menentukan sejauh mana atau seberapa perubahan itu terjadi, sebab penelitian ini hanya melakukan pengukuran pada akhir perlakuan (tidak dapat membandingkan data awal dan data akhir).

#### 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari sampai Juni Tahun 2015.

#### 4.3 Populasi dan Sampel

##### 4.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan yang berumur sekitar 2 – 3 bulan dengan berat badan 200 – 250 gram.

#### 4.3.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus percobaan yang berjumlah 25 ekor yang memenuhi kriteria inklusi.

#### 4.3.3 Kriteria Inklusi

1. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*)
2. Berumur 2 – 3 bulan
3. Berat badan tikus 150 – 200 gram
4. Sehat yang ditandai dengan tikus bergerak aktif

#### 4.3.4 Kriteria Eksklusi

1. Tikus sakit

#### 4.3.5 Kriteria Drop Out

1. Tikus yang sakit
2. Tikus yang mati saat penelitian berlangsung
3. Tikus yang tidak mau makan

#### 4.3.6 Besar sampel

Besar sampel ditentukan dengan menggunakan rumus Ferderer sebagai berikut :

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

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

$$4(r-1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r = 4,75$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan dan r = besar sampel

Dari perhitungan diperoleh besar sampel untuk setiap kelompok perlakuan minimal 4 ekor. Dengan pertimbangan terjadinya drop out maka besar sampel dalam penelitian ini untuk setiap kelompok perlakuan 5 ekor tikus untuk setiap kelompok sehingga total sampel sebanyak 25 ekor tikus.

#### 4.3.7 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan *puposive sampling* yaitu memilih sampel sesuai dengan kriteria inklusi kemudian sampel dikelompokkan dalam 5 kelompok dengan teknik *random sampling* sehingga setiap kelompok terdiri atas 5 ekor tikus yaitu sebagai berikut :

1. Kelompok kontrol negatif yaitu kelompok tikus yang hanya diberi pakan normal
2. Kelompok kontrol positif yaitu kelompok tikus yang diberi diet hiperkolesterol
3. Kelompok perlakuan 1 yaitu kelompok tikus yang diberi diet hiperkolesterol dengan ekstrak lapisan putih kulit semangka 250mg/kgBB/hari
4. Kelompok perlakuan 2 yaitu kelompok tikus yang diberi diet hiperkolesterol dengan ekstrak lapisan putih kulit semangka 500mg/kgBB/hari
5. Kelompok perlakuan 3 yaitu kelompok tikus yang diberi diet hiperkolesterol dengan obat simvastatin 0,9mg/kgBB/hari

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas

Pemberian ekstrak lapisan putih kulit semangka



#### 4.4.2 Variabel Tergantung

Ketebalan tunika intima sampai tunika media

#### 4.4.3 Definisi Operasional

1. Pemberian ekstrak lapisan putih kulit semangka adalah pemberian ekstrak lapisan putih kulit semangka jenis semangka daging berwarna merah yang dihasilkan dari ekstraksi lapisan putih kulit semangka menggunakan etanol yang diberikan pada kelompok perlakuan dengan dosis 250mg/kgBB dan 500mg/kgBB diberikan secara sonde
2. Tikus hiperkolesterolemia adalah tikus putih *Rattus norvegicus* jantan yang berumur 2 – 3 bulan yang dibuat hiperkolesterol melalui pemberian pakan selama 2 bulan sehingga memiliki kadar kolesterol total > 54 mg/dL dan kadar kolesterol LDL > 27 mg/dL.
3. Arteri yang diukur pada penelitian ini adalah arteri ekor. Sediaan histopatologi dengan pengecatan *Hematoxylin Eosin* berupa penampang lumen arteri dan ketebalan arteri yang diukur pada penelitian ini adalah lapisan paling dalam tunika intima hingga lapisan terluar tunika media arteri ekor tikus. Pengukuran ketebalan dilakukan pada satu titik tempat penebalan terbesar terjadi. Pengamatan ketebalan dinding arteri tunika intima hingga media menggunakan mikroskop binokuler dengan pembesaran 100x dan diukur menggunakan *software* Olyvia.

## 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

### 4.5.1 Alat Penelitian

#### 1. Perawatan hewan coba

Kandang berupa baskom persegi panjang dengan ukuran 23cm x 17cm x 9 cm dengan penutup kandang berupa jaring – jaring kawat sebanyak 25 buah, botol minum tikus 25 buah, timbangan analitik, handscoen, pembersih kandang, sekam padi, dan rak tempat meletakkan kandang

#### 2. Pembuatan ransum makanan diet standar dan diet tinggi lemak

Timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, penggiling pakan, nampan, gelas ukur

#### 3. Pemberian ekstrak lapisan putih kulit semangka

Sonde, tabung spuit

#### 4. Pembuatan ekstrak lapisan putih kulit semangka

Oven, timbangan, gelas elenmeyer, corong gelas, kertas saring, labu evaporator, pendingin spiral/rotary evaporator, labu penampung etanol, evaporator, setal water pump, water pump, waterbath, vakum pump, dan botol hasil ekstrasi

#### 5. Pembedahan tikus

Papan paraffin, gunting bedah, pinset, jarum pentul, sterofom, kertas label, kapas, wadah plastik tertutup yang berisi eter, pot organ 25 buah, dan formalin 10%

#### 6. Pengukuran ketebalan arteri

Tissue prosesor, mikroskop binokuler, software OlyVIA

#### 4.5.2 Bahan Penelitian

##### 1. Bahan makanan tikus

Pakan tikus dewasa setiap ekor adalah 40 gram/hari. Dalam penelitian ini terdapat dua macam pakan tikus yaitu pakan tikus dengan diet normal dan pakan tikus dengan diet tinggi lemak. Adapun komposisi pakan normal dan pakan tinggi lemak akan dijelaskan sebagai berikut :

- a. Pakan normal terdiri dari PARS 25,6 gram, tepung terigu 14 gram, air 0,4 gram.
- b. Diet tinggi lemak diberikan 40 gram setiap hari per tikus. Komposisi diet tinggi lemak persaji (40 gram) terdiri atas PARS 20 gram, terigu 10 gram, kuning telur bebek 2 gram, lemak kambing 4 ml, minyak kelapa 0,4 ml, minyak babi 3,22 ml, dan asam kolat 0,05 gram.

##### 2. Bahan ekstrak lapisan kulit putih semangka dan simvastatin

Lapisan putih kulit semangka diperoleh dari semangka jenis buah semangka merah tanpa biji yang diperoleh dari pasar buah Jombang Malang, simvastatin dibeli dari apotik produksi kimia farma, etanol 96%, dan aquades.

#### 4.6 Ekstraksi Lapisan Putih Kulit Semangka

##### 4.6.1 Cara Pembuatan Ekstrak

##### 1. Proses Pengeringan

- a. Semangka dicuci, dibelah, dikupas, dipisahkan antara daging bagian merah dan putih kemudian ambil bagian putihnya
- b. Bersihkan bagian putih semangka dan potong kecil – kecil



c. Masukkan kedalam oven pengeringan dengan suhu 40 – 60°C

## 2. Proses Ekstrasi

a. Setelah kering haluskan menggunakan blender

b. Ambil sebanyak 100 gram yang akan dijadikan sebagai sampel kering

c. Masukkan 100 gram sampel kering pada gelas elenmeyer ukuran 1 liter

d. Rendam dengan etanol sampai volume 900 ml dan kocok sampai larutan tercampur  $\pm$  30 menit. Diamkan semalam sampai mengendap

e. Ambil lapisan atas campuran etanol dan zat aktif yang sudah tercampur dengan cara disaring menggunakan kertas saring

f. Lakukan proses perendaman ini sebanyak 3 kali

## 3. Proses Evaporasi

a. Masukkan pada labu evaporasi ukuran 1 liter

b. Pasang labu evaporasi dalam evaporator

c. Isi waterbath dengan air sampai penuh

d. Pasang semua rangkaian alat (rotary evaporator, pemanas waterbath) dan atur sesuai titik didih pelarut kemudian sambungkan dengan aliran listrik

e. Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampungan. Hasil yang diperoleh kira – kira seperempat dari bahan alam kering

- f. Masukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik tertutup rapat (ekstrak kental yang diperoleh dari 100 gram berat kering yaitu 22 gram)
- g. Simpan dalam pendingin hingga siap untuk digunakan

#### 4.6.2 Cara Perhitungan Dosis Ekstrak Lapisan Putih Kulit Semangka

Dosis ekstrak lapisan putih kulit semangka yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sugyanta (2011) yaitu pemberian ekstrak lapisan putih kulit semangka dosis 250mg/kgBB/hari dan dosis 500mg/kgBB/hari mampu menurunkan kadar glukosa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotosin.

Selanjutnya dilakukan perhitungan dosis untuk tiap kelompok tikus dengan berat  $\pm$  200 gram sebagai berikut :

1. Dosis 250mg/kgBB/hari  
= 250mg/1000g/hari  
= 50mg/200g/hari
2. Dosis 500mg/kgBB/hari  
= 500mg/1000g/hari  
= 100mg/200g/hari

Adapun volume ekstrak lapisan putih kulit semangka yang diberikan pada setiap tikus sebanyak 1 ml diberikan secara oral menggunakan sonde. Volume yang boleh diberikan mengacu pada volume normal lambung tikus yaitu 3 – 5 ml. Jika volume ekstrak yang diberikan melebihi volume lambung dapat berakibat dilatasi lambung secara akut yang dapat menyebabkan robeknya saluran cerna (Ngatidjan, 2006).



## 4.7 Prosedur Perlakuan Terhadap Hewan Coba

### 4.7.1 Tahap Adaptasi

Pada tahap adaptasi, semua tikus diadaptasikan pada kondisi lingkungan penelitian yaitu Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang selama satu minggu dengan diberi pakan standar dan minum air secara *ad libitum*.

### 4.7.2 Tahap Induksi

Sebelum tikus diinduksi dengan pakan hiperkolesterol, tikus dipilih secara acak dan dibagi 5 kelompok, setiap kelompok terdiri atas 5 ekor tikus. Kelompok kontrol negatif hanya diberikan pakan standar selama penelitian. Selanjutnya seluruh tikus (kecuali 5 ekor tikus kontrol negatif) diinduksi dengan pakan tinggi kolesterol 40mg/hari selama 4 minggu untuk menginduksi terjadinya hiperkolesterolemia.

Setelah 1 bulan diperkirakan telah terjadi peningkatan kadar kolesterol darah, selanjutnya dilakukan perlakuan sesuai dengan pembagian kelompok tikus percobaan. Hewan coba ditempatkan dalam kandang plastik berukuran 23cm x 17cm x 9cm, tiap kandang berisi 1 ekor tikus. Dilakukan penggantian sekam setiap 3 hari. Pembagian kelompok tikus percobaan sebagai berikut :

- a. KN : Kelompok kontrol negatif yang diberi pakan normal dan air minum
- b. KP : Kelompok kontrol positif yang diberi pakan tinggi kolesterol dan air minum
- c. K1 : Kelompok yang diberi pakan tinggi kolesterol, air minum, dan ekstrak lapisan putih kulit semangka 50mg

- d. K2 : Kelompok yang diberi pakan tinggi kolesterol, air minum, dan ekstrak lapisan putih kulit semangka 100mg
- e. K3 : Kelompok yang diberi pakan tinggi kolesterol, air minum, dan simvastatin 0,18mg

Volume ekstrak lapisan putih kulit semangka yang diberikan yaitu 1ml per satu ekor tikus per hari yang diberikan secara sonde oral pada sore hari dengan pemberian secara sonde selama 4 minggu pada tikus dengan berat badan rerata 200 gram.

#### **4.7.3 Tahap Pembedahan dan Pengambilan Jaringan Arteri Tikus**

Setelah 4 minggu pemberian ekstrak lapisan putih kulit semangka, dilakukan pembedahan tikus, sebelum pembedahan dilakukan, tikus dipuasakan selama 10 jam. Setelah itu, tikus di euthanasia dengan cara dimasukkan ke sebuah wadah plastik tertutup yang berisi eter, kemudian di bedah dan diambil bagian arteri dari ekor tikus. Arteri yang didapat dimasukkan ke dalam formalin 10% untuk diawetkan sebelum pembuatan slide.

### **4.8 Pemeriksaan Ketebalan Arteri**

#### **4.8.1 Pembuatan Slide**

Pembuatan slide dimulai dari pemotongan jaringan  $\pm 2 - 3$  mm dan dimasukkan ke dalam kaset yang dimasukkan ke dalam formalin 10% untuk di fiksasi kemudian di proses menggunakan mesin tissue prosesor. Selanjutnya dilakukan pengeblokan jaringan yang telah diangkat dari mesin tissue prosesor, kemudian jaringan tersebut dipotong dengan mesin microtome sepanjang  $\pm 3 - 5$  mikron. Setelah dipotong dilakukan deparafinasi dengan memasukkan ke dalam oven selama 1 – 2 jam dengan suhu 60°C,

kemudian dimasukkan ke dalam larutan xylol, masing – masing 15 menit. Setelah itu dimasukkan ke dalam tabung berisi alkohol 96% selama 3 menit dan dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Jaringan kemudian diwarnai dengan menggunakan pewarnaan HE, yaitu dengan memberi jaringan cat utama Haris Hematosiklin selama 10 – 15 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Preparat kemudian dimasukkan ke dalam alkohol asam 1%, amoniak air, kemudian dimasukkan ke dalam cat pembanding yaitu Eosin 1% selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi dengan memasukkan preparat ke dalam alkohol 80% selama 3 menit dan alkohol 96% selama 3 menit. Terakhir preparat dijernikan dengan larutan xylol selama 15 menit sebanyak 2 kali, lalu mounting dengan entelan dan deck glass.

#### 4.8.2 Pengukuran Ketebalan Arteri

Pengukuran ketebalan arteri menggunakan *Dot Slide Microscope*. Slide preparat yang telah jadi discan menggunakan mikroskop binokuler. Hasil gambar preparat yang diperoleh dibaca menggunakan *software OlyVIA* dengan pembesaran 100x. Pengukuran dilakukan dengan mengukur 1 tempat dengan ketebalan paling besar dari tunika intima hingga tunika media arteri, dimana dicurigai letak penebalan terjadi.

#### 4.9 Pengumpulan Data

Berat badan tikus ditimbang seminggu sekali. Data asupan makanan diperoleh setiap hari dengan cara penimbangan berat makanan sebelum (40 gram) dengan sesudah pemberian. Data rata – rata asupan makanan diperoleh dengan pembagian jumlah keseluruhan asupan dengan jumlah tikus pada masing – masing perlakuan. Data rata – rata ketebalan dinding diperoleh dengan



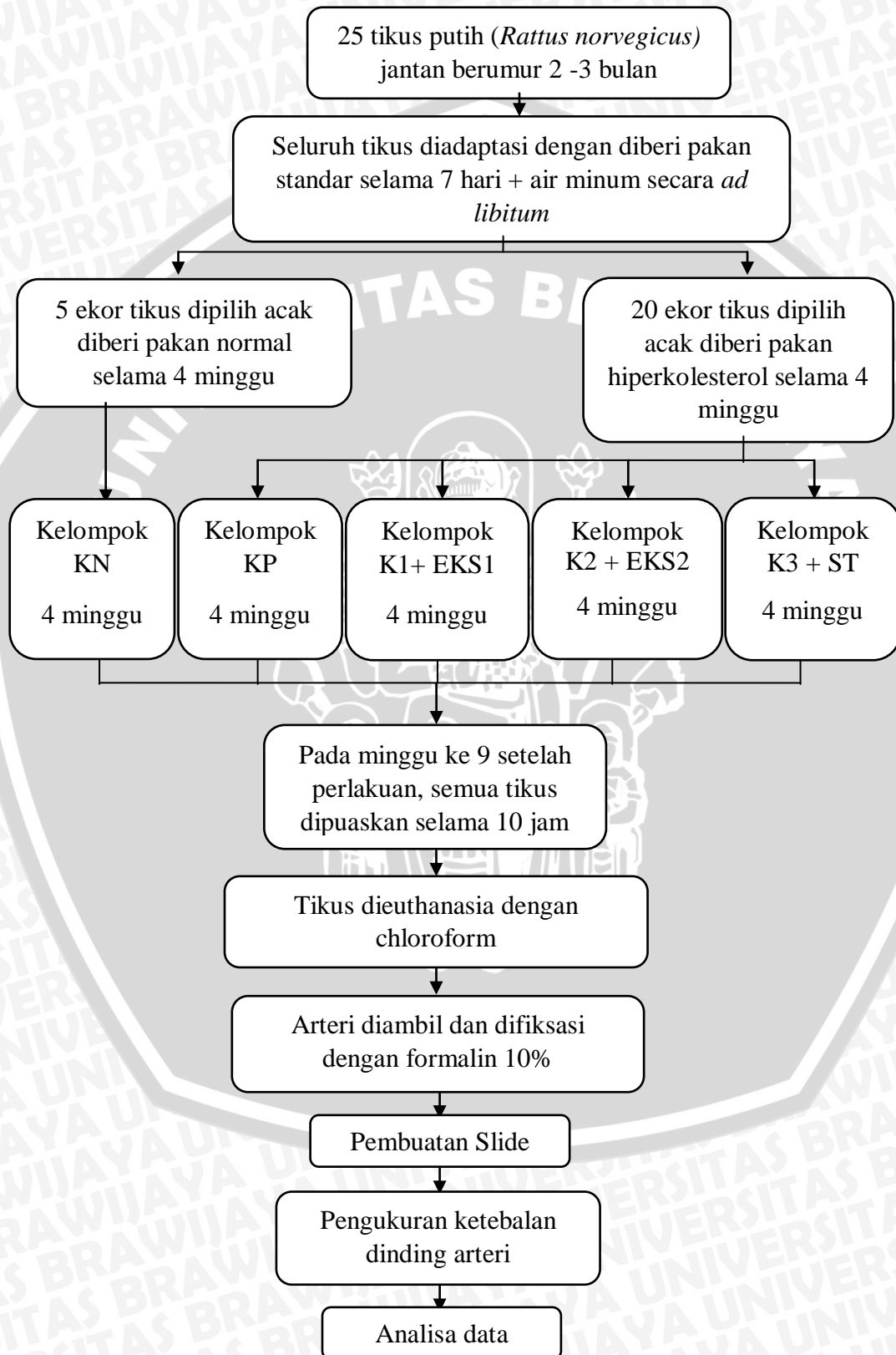
pembagian jumlah keseluruhan tebal dinding arteri dengan jumlah tikus pada masing – masing perlakuan.

#### 4.10 Pengolahan dan Analisis Data

Analisis data yang dipakai adalah statistik parametrik, yaitu menggunakan *One Way Anova*. Analisis statistik ini menguji apakah rata – rata lebih dari 2 sampel menunjukkan perbedaan yang signifikan atau tidak. Uji yang dilakukan pertama kali adalah uji normalitas *Shapiro-Wilk* data dan uji homogenitas *Levene*. Apabila data signifikan ( $p < 0,05$ ) akan dilakukan uji *Post Hoc LSD* untuk mengidentifikasi perbedaan antar kelompok. Analisis data menggunakan program *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS) for Windows* versi 20.0.



#### 4.11 Alur Penelitian



## Keterangan :

- KN : Kelompok kontrol negatif yang diberikan pakan normal
- KP : Kelompok kontrol positif yang diberikan pakan diet tinggi kolesterol
- K1 + EKS1 : Kelompok kontrol positif 1 yang diberikan pakan diet tinggi kolesterol dan ekstrak lapisan putih kulit semangka dosis 250 mg/kgBB
- K2 + EKS2 : Kelompok kontrol positif 2 yang diberikan pakan diet tinggi kolesterol dan ekstrak lapisan putih kulit semangka dosis 500 mg/kgBB
- K3 + ST : Kelompok kontrol positif 3 yang diberikan pakan diet tinggi kolesterol dan simvastatin dosis 0,9 mg/kgBB
- : Tahap penelitian selanjutnya

