

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus – Juni 2014 di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner PKH Universitas Brawijaya, Laboratorium Fisiologi Hewan, Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya, Poliklinik Universitas Brawijaya, Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga serta Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit dr. Soetomo Surabaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan peralatan yaitu kandang tikus, alat bedah, cawan petri, *animal restrain*, alat sonde lambung, gelas ukur, labu ukur (500 ml dan 1000 ml), *reagent bottle*, corong kaca, erlenmeyer, *microtube*, tabung reaksi, vortex (*Guo-Huq*), pipet ukur, bulb, aluminium foil, *autoclave*, bunsen, alat sentrifuge (*Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge*, *Sorvall Legend Micro 17*), kompor, panci, spatula, *waterbath*, mikropipet, pH meter (*Eutech Instrument Cyberscan Ph 310*), pH indicator, *cooler box*, gelas objek, *bekker glass* (50 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml), *timer*, neraca analitik (*Precisa 3000 D*), neraca *O’Haus*, mesin *freeze dried* (*Christ Beta 1-8K*), *refrigerator*, termometer, mikroskop cahaya (*Olympus BX51*), dan inkubator (*Memmert*).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar umur 10-12 minggu dan berat badan 100-150

gram, kuning telur puyuh, asam kholat (Catalog No: M5M5306), minyak babi, PBS, PBS Azida, PFA 4%, susu kambing, starter *yogurt met freeze dried Lyo-San Inc. 500 Aeroparc, C.P. 598, Lachute, Qc, Canada J8H 4G4 (Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, dan Streptococcus thermophilus)*, alkohol, spirtus, aquades, NaOH, NaCl fisiologis 0,9%, NaCl, pewarna Hematoksilin Eosin (HE), parafin, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, xylol, H₂O₂, BSA 1 %, methanol absolut, etanol absolut, antibodi primer *mouse* anti INOS, antibodi sekunder *rabbit anti-mouse* IgG berlabel biotin, *diamino benzidine* (DAB).

4.3 Tahapan Penelitian

1. Preparasi dan aklimatisasi hewan model tikus (*Rattus norvegicus*).
2. Pembuatan dan pemberian diet hiperkolesterolemia.
3. Penentuan dosis dan terapi *yogurt* susu kambing .
4. Pengambilan organ jantung dan pemeriksaan histopatologi jantung.
5. Pemeriksaan ekspresi INOS.
6. Analisis data.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Model Tikus

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tikus dibagi menjadi lima kelompok yaitu kelompok kontrol, hiperkolesterolemia, hiperkolesterolemia dengan terapi *yogurt* dosis 300 mg/kg, hiperkolesterolemia dengan terapi *yogurt* dosis 600 mg/kg dan hiperkolesterolemia dengan terapi *yogurt* dosis 900 mg/kg (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan

Kelompok Tikus	Perlakuan
A.	Tikus kontrol, yaitu tikus tanpa perlakuan.
B.	Tikus Hiperkolesterolemia, yaitu tikus dengan perlakuan induksi diet hiperkolesterolemia selama 14 hari .
C.	Tikus Hiperkolesterolemia dengan terapi <i>yogurt</i> dosis 300 mg/kg per ekor selama 28 hari.
D.	Tikus Hiperkolesterolemia dengan terapi <i>yogurt</i> dosis 600 mg/kg per ekor selama 28 hari.
E.	Tikus Hiperkolesterolemia dengan terapi <i>yogurt</i> dosis 900 mg/kg per ekor selama 28 hari.

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Pemberian diet hiperkolesterolemia dan terapi *yogurt* susu kambing.

Variabel tergantung : Ekspresi INOS dan gambaran histopatologi jantung.

Variabel kontrol : Umur tikus, berat badan tikus, jenis kelamin.

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar berumur 10-12 minggu. Berat badan tikus sekitar 100-150 gram. Estimasi sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2010) :

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka dalam setiap kelompok diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor tikus. Diagram alir kerangka operasi dapat dilihat pada (**Lampiran 3**).

Tikus dikandangkan pada kandang yang berukuran 17,5 cm x 23,75 cm x 17,5 cm berbahan plastik dengan tutup kawat serta rantai kandang mudah disanitasi dan dibersihkan. Kondisi ruang penyimpanan sebaiknya berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan bebas polusi.

4.4.2 Pembuatan Diet Hiperkolesterolemia (Gani *et al.*, 2013)

Pembuatan pakan diet hiperkolesterol terdiri dari campuran asam kholat 0,1%, minyak babi 10%, dan kuning telur puyuh rebus 5% kemudian dilarutkan dalam air sampai volume 2 ml.

4.4.3 Induksi Diet Hiperkolesterolemia

Pakan diet hiperkolesterol diberikan kepada kelompok B, C, D, E. Pemberian dilakukan secara sonde oral per tikus sebanyak 3,02 gr dan ditambah aquades hingga 2 ml. Pemberian diet kolesterol ini dilakukan selama 14 hari pada hari ke 8 – 21 (**Lampiran 2**).

4.4.4 Preparasi *Yogurt* Susu Kambing dan Penentuan Dosis

Preparasi *yogurt* dilakukan sesuai prosedur yaitu melalui tahap :

1. Pembuatan starter menurut Posecion *et al.*, 2005 :
 - a. Susu kambing 100 ml dipasteurisasi pada suhu 72° C selama 5 menit lalu didinginkan hingga mencapai suhu 45° C.
 - b. Inokulasi starter sebanyak 0,5 gram ke dalam 100 ml susu kambing yang telah di pasteurisasi.
 - c. Inkubasi susu kambing pada suhu 45° C dan diperoleh pH starter *yogurt* 4,5 - 5 selama ± 4 jam kemudian simpan dalam *refrigerator*.
2. Pembuatan *yogurt* susu kambing menurut Aswal *et al.*, 2012 meliputi :
 - a. Pasteurisasi dengan cara susu kambing sebanyak 500 ml dipanaskan hingga suhu 72° C selama 15 menit lalu didinginkan hingga menjadi 45° C.
 - b. Inokulasi starter sebanyak 3% ke dalam susu kemudian dihomogenkan dengan cara digoyang ringan.
 - c. Inkubasi pada suhu 45° C selama ± 4 jam hingga mencapai pH 4,5 – 5 kemudian simpan *yogurt* kedalam *refrigerator* (**Lampiran 4**).

3. Proses *freeze drying* dilakukan dengan prosedur :

- a. *Yogurt* dimasukkan ke dalam *reagent bottle* sebanyak 250 ml kemudian dipasang pada alat pemutar dan harus menempel pada permukaan ethanol.
- b. *Yogurt* disentrifus pada kecepatan 1500 rpm selama 5-7 menit pada suhu -33°C sampai berbentuk beku.
- c. Dilakukan proses penyubliman pada *yogurt* beku sampai menimbulkan uap. Uap yang dihasilkan ditangkap oleh spiral mesin sehingga air terserap keluar. *Yogurt* akan berubah menjadi serbuk dalam waktu 14 jam.

4.4.5 Terapi Tikus dengan *Yogurt* Susu Kambing

Metode pemberian terapi *yogurt* per oral tiap ekor tikus pada hari ke 22 sampai hari ke 49 yaitu dari penentuan dosis terapi dibagi menjadi tiga perlakuan diantaranya : 300 mg/kg BB diberikan pada tikus kelompok C, dosis 600 mg/kg BB untuk tikus kelompok D dan dosis 900 mg/kg BB untuk tikus kelompok E. Masing - masing kelompok terdiri dari 4 ekor dan setiap dosis terapi menggunakan volume pengenceran 1,5 ml (**Lampiran 5**).

4.4.6 Pengujian Kadar Kolesterol Serum Darah

Tikus terlebih dahulu diletakkan di alat *restrain tikus* (pengecekan serum darah pada hari ke 8 untuk kelompok kontrol negatif, hari ke 22 untuk kelompok diet kolesterol dan hari ke 50 untuk kelompok yang diberi terapi *yogurt*)

(Lampiran 6). Hasil pemeriksaan kadar kolesterol tikus terlampir pada (Lampiran 13)

4.4.7 Pengambilan Organ Jantung

Pengambilan organ jantung dimulai dengan euthanasi tikus dengan cara dislokasi leher, selanjutnya dilakukan pembedahan bagian abdomen. Jantung diperoleh dengan mengeluarkan isi abdomen terlebih dahulu kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis 0.9% dan direndam pada larutan Paraformaldehid (PFA) 4%. Pembuatan larutan dapat dilihat pada (Lampiran 10). Organ jantung digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi dan imunohistokimia untuk pengukuran ekspresi INOS (Lampiran 7).

4.4.8 Pembuatan dan Pengamatan Gambaran Histopatologi Jantung

Proses pembuatan preparat histopatologi menurut Junquiera and Carneiro (2007), terdiri dari tahapan fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, *embedding*, *sectioning*, penempelan di gelas objek, dan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) (Lampiran 8).

Preparat histopatologi jantung diamati secara visual menggunakan mikroskop *Olympus BX51* perbesaran lemah (400x) dilanjutkan perbesaran kuat (1000x)

4.4.9 Pengamatan ekspresi INOS dengan Metode Imunohistokimia

Adapun cara kerjanya dimulai dengan preparat Hematoksilin Eosin (HE)

jantung dideparafinisasi, lalu dilanjutkan dengan rehidrasi. Selanjutnya pencucian dilakukan dengan aquades dan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4. Dilanjutkan dengan perendaman dalam 3% H₂O₂, kemudian preparat dicuci seperti sebelumnya. Langkah selanjutnya yaitu *blocking*. *Blocking* dilakukan dengan menggunakan 1% BSA selama 45 menit. Kemudian diinkubasi dengan antibodi primer *mouse anti INOS antibody* dan diinkubasi selama semalam pada suhu 4°C lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Jaringan ditetesi antibodi sekunder *rabbit anti mouse IgG* berlabel biotin dan diinkubasi selama 1 jam. Jaringan lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Jaringan ditetesi *Streptavidin-Horseradish Peroxidase* (SA-HRP) selama 40 menit. Jaringan lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Kemudian ditambahkan kromagen *Diamino Benzidine* (DAB). Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Preparat dilakukan *counterstaining* dengan *Mayer's Hematoxylin* selama 5 menit lalu dicuci dengan air mengalir. Tahap terakhir preparat kemudian dikering anginkan dan dilanjutkan *mounting* menggunakan *entellan* lalu ditutup dengan *cover glass* (Ramos, 2005) (**Lampiran 9**).

Hasil pembuatan preparat imunohistokimia diamati secara kualitatif dengan mikroskop cahaya *Olympus BX51* perbesaran lemah 100x kemudian dilanjutkan dengan perbesaran kuat 400x. Selanjutnya diamati secara kuantitatif untuk melihat ekspresi INOS dengan bantuan *software axio vision*© melalui pengamatan 5 lapang pandang untuk mendapatkan presentase area.

4.5 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan secara kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif untuk gambaran histopatologi jantung yang akan dianalisis serta disajikan secara deskriptif dan data kuantitatif untuk mengetahui ekspresi INOS yang dianalisis dengan SPSS 16.0 *Edition for Windows*.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

