

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian/Desain

Jenis penelitian ini adalah *true experimental* dengan desain penelitian *Randomized Only Post Test Controlled Group Design* secara *in vivo* pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) subjek penelitian.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*). Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan. Preparat per kelompok ditentukan dengan rumus Federrer. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel sebagai berikut (Solimun, 2001):

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

Dengan rincian :

t = jumlah perlakuan, pada penelitian ini t=5

r = jumlah sampel penelitian

Berdasarkan rumus di atas, jumlah pengulangan yang akan dilakukan adalah:

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$r \geq 4,75$$

$$r \approx 5$$

Jadi banyaknya jumlah pengulangan minimal 5 kali untuk setiap perlakuan. Sehingga, jumlah preparat yang digunakan pada penelitian ini sejumlah 5 preparat x 5 kelompok = 25 preparat sesuai dengan rumus Federrer.

Pembagian Kelompok	Perlakuan
1	Kelompok kontrol dengan diet normal
2	Kelompok kontrol positif dengan pemberian <i>High Fat Diet</i> (HFD) tanpa pemberian Peptida Polisakarida (PSP)
3	Kelompok dengan perlakuan <i>High Fat Diet</i> (HFD) + PSP 50 mg/kgBB
4	Kelompok dengan perlakuan <i>High Fat Diet</i> (HFD) + PSP 150 mg/kgBB
5	Kelompok dengan perlakuan <i>High Fat Diet</i> (HFD) + PSP 300 mg/kgBB

Tabel 4.1. Pembagian Kelompok dan Perlakuannya

4.2.1. Kriteria Sampel

Kriterita inklusi preparat yang sesuai

- a. Tikus wistar (*Rattus Norvegicus*)
- b. Berusia 6-8 minggu
- c. Berat badan 150-200 gram
- d. Kondisi sehat dan tidak ada kelainan anatomik

Kriteria eksklusi

- a. tikus mengalami diare selama masa penelitian yang ditandai dengan feses tidak terbentuk atau mengalami penurunan berat badan
- b. tikus sakit atau mati selama masa penelitian
- c. tikus yang selama penelitian tidak mau makan

4.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi :

1. Variabel bebas : pemberian Peptida Polisakarida (PSP)
2. Variabel terikat : jumlah vasa vasorum setelah diberikan Peptida Polisakarida (PSP)

4.4 Lokasi Penelitian

Penelitian yang dilakukan berlokasi di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Biosains dan Laboratorium Patologi Anatomi (PA) FKUB.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang dibutuhkan untuk penelitian ini antara lain:

1. Peralatan untuk fiksasi jaringan dengan formalin 10%.
2. Mikroskop dengan perbesaran 400 kali untuk pengamatan sediaan aorta.
3. Komputer dengan software *dstslide Olyvia* untuk melakukan penghitungan vasa vasorum dari aorta tikus.

Sedangkan bahan yang digunakan untuk penelitian ini antara lain:

1. Formalin untuk pengawetan sediaan aorta.
2. Pewarnaan Hematoksilin Eosin.
3. Kaca benda untuk fiksasi sediaan aorta.
4. Larutan Xylol I dan Xylol II
5. Alkohol 70%, alkohol 96%, dan alkohol absolut

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian tersebut dapat dijelaskan dengan tabel di bawah ini:

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur (Parameter)	Hasil Ukur	Skala Ukur
Vasa Vasorum	Diamati dengan pengecatan hematoksilin eosin (HE) secara detail dengan mikroskop pembesaran 400x menggunakan mikroskop BX 53 (<i>Olympus Corporation</i>)	Perhitungan vasa vasorum dilakukan secara manual dengan software Olyvia dan menghitung seluruh lapang pandang.		
Pemberian <i>High Fat Diet</i> (HFD)	Pakan diberikan seberat 26 gram HFD diberikan setiap hari		Gram	Rasio

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1. Pengurusan Etik Penelitian

Penelitian ini diawali dengan pembuatan dan pengurusan etik (*ethical clearance*) yang meliputi proposal, formulir layak etik, dan penjelasan etik penelitian. Penelitian mengenai pengaruh Peptida Polisakarida PSP *Ganoderma lucidum* terhadap DM Tipe 2 mendapatkan izin dari Komisi Etik FKUB dengan nomor 267/EC/KEPK-S1-PD/07/2017

4.7.2. Pembuatan Slide

Potongan organ dipotong, yaitu aorta secara representative kemudian segera difiksasi dengan formalin 10% selama 3 jam. Kemudian, dicuci dengan air mengalir selama 1 menit. Organ kemudian dikecilkan hingga ukuran 3 mm kemudian dimasukkan ke dalam *tissue cassette* kemudian ke tahap dehidrasi. Tahap dehidrasi memakai alkohol yang semakin pekat dimulai dari alkohol 70%, alkohol 96%, dan alkohol absolut. Tahapan fiksasi jaringan dilakukan dengan paraffin selama 1 jam dan dipindahkan satu per satu dari *tissue cassette* ke dasar pan dengan mengatur jarak. Paraffin yang berisi potongan aorta dilepaskan dari pan dengan dimasukkan ke dalam suhu 4-6⁰C beberapa saat lalu diletakkan pada balok kayu dan diratakan pinggirannya. Tahap pemotongan jaringan dilakukan dengan pemotongan kasar, kemudian dilanjutkan pemotongan halus sebesar 4-5 mikron. Pemotongan menggunakan *rotary microtome*. Dipilih dengan lembaran potongan yang baik, diapungkan pada air dan dihilangkan kerutannya. Slide yang berisi jaringan berupa aorta ditempatkan pada incubator (suhu 37⁰C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

4.7.3. Pewarnaan Slide Aorta

Tahapan pewarnaan menggunakan prosedur pulasan *Hematoksilin Eosin* (HE *staining*). Setelah jaringan melekat sempurna pada slide, dipilih slide yang terbaik secara berurutan dengan larutan xylol I dan xylol II masing-masing 5 menit. Kemudian dilanjutkan dengan hidrasi dalam menggunakan alkohol 96% lalu dilakukan pulasan inti dibuat dengan menggunakan hematoksilin selama 15 menit, dibersihkan dengan air mengalir, dan menggunakan eosin selama maksimal 1

menit. Tahapan penjernihan menggunakan larutan xylol I dan xylol II selama 2 menit. Setelah pewarnaan selesai, slide ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan mounting yaitu entelan dan ditutup dengan *deck glass*, dicegah agar tidak membentuk gelembung udara.

4.7.4. Pengukuran Jumlah Vasa Vasorum

Pengukuran jumlah vasa vasorum dilakukan setelah pembedahan tikus dengan jaringan yang akan diamati yaitu aorta. Fiksasi pada jaringan dilakukan dengan metode parafin blok yang kemudian diletakkan pada kaca benda (*slide*) untuk diamati vasa vasorum. Kemudian sediaan aorta yang digunakan untuk mengamati vasa vasorum diberi pewarnaan *Hematoksilin Eosin (HE Staining)* agar vasa vasorum dapat diamati. Setelah itu, pembacaan vasa vasorum dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400 x dan software *dotSlide Olyvia* dengan lapangan pandang 10 kali untuk setiap sediaan aorta. Identifikasi vasa vasorum dapat dilihat di tunika adventitia pada aorta. Pengukuran vasa vasorum dilakukan dengan *blind test*, yaitu menutup label tiap preparat sehingga mencegah terjadinya bias pada penelitian.

4.8. Analisis Data

Pengambilan data dan analisis dilakukan setelah setelah fase perlakuan. Analisis ditentukan terhadap perhitungan jumlah vasa vasorum pembuluh darah pada tikus *Rattus Norvegicus*. Analisis data diawali dengan uji normalitas Shapiro-Wilk bertujuan untuk mengetahui data penelitian normal atau tidak normal, dikatakan normal apabila $p \geq 0,05$. Lalu dilanjutkan dengan uji Levene untuk menentukan uji

homogenitas dan dikatakan homogenya apabila $p \geq 0,05$. Kemudian dilanjutkan dengan uji One-Way ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan terhadap jumlah vasa vasorum. Apabila ditemukan perbedaan yang signifikan pada minimal 2 kelompok perlakuan, maka akan dilakukan uji Post Hoc Duncan untuk dilakukan identifikasi pada kelompok tersebut.

4.9 Alur penelitian

