

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan desain *post test-only control group*.⁴⁰ Subyek dipilih secara acak ke dalam kelompok-kelompok yang diekspose sebagai variabel independen dan diberi *post test*. Nilai-nilai *posttest* kemudian dibandingkan untuk menentukan keefektifan perlakuan. Desain terdapat pada gambar 4.1 dibawah ini.

		<i>Pretest</i>	Perlakuan	<i>Posttest</i>
Kontrol	R	-	X1	O2
Eksperimen	R	-	X3	O4
Eksperimen	R	-	X5	O6

Keterangan :

R : Randomisasi sampel

X : Manipulasi variabel eksperimen

O : Observasi atau tes

Cara pengambilan sampel dengan randomisasi sederhana

Gambar 4.1. Desain Rancangan Penelitian

4.2. Populasi dan Sampel

4.2.1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus galur Wistar.

4.2.2. Sampel

Sampel penelitian ini ditentukan menurut rumus Federrer *cit* Kustiyah dan Prasetyo (2003), yaitu; $(t-1)(n-1) > 15$, dimana (t) adalah kelompok perlakuan, dan

(n) adalah jumlah sampel perkelompok perlakuan. Tikus Wistar dibagi dalam dua kelompok kontrol perlakuan dan empat kelompok perlakuan, dan jumlah sampel per kelompok lima ekor, sehingga didapat jumlah sampel 30 ekor tikus.¹¹⁻¹²

4.3. Kriteria Inklusi, Eksklusi dan *Drop Out*

4.3.1. Kriteria inklusi

- a. Berat tubuh 180-200 gram pada umur 20 minggu, jenis kelamin jantan
- b. Kondisi sehat yang ditandai dengan nafsu makan baik.

4.3.2. Kriteria eksklusi

- a. Tikus mengalami diare selama masa penelitian yang ditandai dengan feses tidak berbentuk dan atau mengalami penurunan berat badan.
- b. Tikus mati selama masa perlakuan

4.3.3. *Drop out*

Tikus dinyatakan *drop-out*, apabila sesuai kriteria eksklusi dan diganti tikus lain yang sesuai dengan kriteria inklusi, sehingga didapat jumlah tikus sesuai ketentuan sampel.

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Klasifikasi Variabel

- a. Variabel bebas; variabel bebas dalam penelitian ini adalah diet kuning telur, pemberian perasan pare dan pemberian perasan pare plus kuning telur.
- b. Variabel tergantung; variabel tergantung pada penelitian ini adalah profil lipid (kolesterol total, LDL, HDL, trigliserida), jumlah sel busa dan ketebalan dinding aorta abdominalis.

4.4.2. Definisi Operasional

- a. Injeksi adrenalin i.v adalah pemberian satu kali injeksi adrenalin bitratras pada hari pertama perlakuan secara intra vena, lewat vena di ekor tikus, dengan dosis 0,006 mg, skala nominal, dengan nilai 1 jika diberi injeksi adrenalin dan 0 jika tidak diberi injeksi adrenalin.
- b. Diet kuning telur adalah pemberian 5 gram kuning telur melalui sonde lambung, setiap hari sekali. Skala nominal, dengan nilai 1 jika diberi diet kuning telur dan 0 jika tidak diberi kuning telur.
- c. Pemberian perasan *Momordica charantia* adalah pemberian hasil perasan buah pare segar yang dimasukkan ke alat juicer, dengan dosis 1,5 cc yang didapatkan dari rumus konversi kelinci dengan berat 1,5 kilogram ke tikus. Skala nominal, dengan nilai 1 jika diberi diet perasan pare dan 0 jika tidak diberi perasan pare.
- d. Profil lipid adalah kadar kolesterol total, LDL, HDL, dan trigliserida serum darah, yang diukur secara enzimatik dengan spektrofotometer, skala rasio.
- e. Jumlah sel busa adalah hitung sel busa di tunika intima dan media secara kuantitatif pada potongan melintang aorta abdominalis setebal 5 mikron dengan metode potong beku yang dipulas dengan pengecatan *HE*, skala rasio.
- f. Ketebalan dinding aorta abdominalis adalah pengukuran ketebalan aorta dari tunika intima sampai tunika media (pada potongan penampang melintang aorta abdominalis dalam satuan ukuran mikron, yang dipulas

dengan *Hematoksin Eosin*), diamati dengan mikroskop yang dilengkapi *ocular micrometer*, dilihat berapa persen penebalan di delapan zona, skala rasio.

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1. Alat

- a. Untuk pemeliharaan dan pemberian perlakuan adalah kandang hewan dan sonde lambung.
- b. Untuk pemeriksaan kadar lipid adalah spektrofotometer Metertex, centrifuge, tabung reaksi, pipet *ependorf*, pipet hematokrit.
- c. Untuk pembuatan sediaan histopatologi adalah inkubator suhu 56⁰C, mikrotom, kaca obyek dan kaca penutup serta mikrotom potong beku.
- d. Untuk pemeriksaan histopatologi berupa; formalin *buffer* 10%, alkohol 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, alcohol absolut, larutan *xylol*, *paraffin* cair (histoplat), albumin, bahan pulasan HE, balsam *Canada* dan *entelan*.
- e. Bahan pemeriksaan potong beku, dan bahan pulasan *HE*.

4.5.2. Bahan

- a. Kuning telur yang dipisahkan dari putihnya dan dibuat emulsi dengan cara mengocok perlahan.
- b. Pakan standar AIN-93 serta air minum
- c. Adrenalin bitartras injeksi
- d. Perasan buah pare segar yang diambil melalui alat *juicer*, diambil sarinya dan dibuang ampasnya (seratnya).

- e. Bahan-bahan untuk prosesi jaringan terdiri atas formalin *buffer* 10%, alkohol bertingkat, alcohol absolute, larutan *xylol*, *paraffin* cair, albumin, bahan pulasan HE, balsam *Canada* dan *entelan*.
- f. Bahan pemeriksaan potong beku dan bahan pewarnaan *Sudant Black*

4.6. Prosedur Penelitian

Ransum pakan dibuat berdasarkan diet murni dari AIN (*American Institute of Nutrition*) 93M, dan pemberian minuman dilakukan secara *ad libitum*. Ransum pakan standar ini diberikan pada semua tikus selama penelitian.

Injeksi adrenalin dilakukan secara intra vena pada ekor tikus, yang dilakukan dengan cara; 1) masukkan tikus ke dalam kotak berlobang, sehingga ekor bisa ditarik keluar, 2) kompres ekor tikus dengan kapas yang dibasahi air hangat selama sekitar lima menit agar terjadi vasodilatasi vena, 3) injeksi vena dengan kemiringan 15 derajat, lalu diaspirasi. Apabila telah yakin jarum sudah masuk ke dalam vena (*sput* terdapat darah saat diaspirasi), maka injeksi perlahan dilakukan.

Diet kuning telur dibuat dengan cara; 1) memisahkan kuning telur dari putihnya, 2) membuat emulsi kuning telur dengan cara mengocok perlahan, 3) menimbang emulsi kuning telur. Diet kuning telur ditentukan sebesar 3-4% BB tikus atau sekitar 5 gram, diberikan lewat sonde lambung setiap hari. Diet kuning telur ini diberikan pada semua tikus mulai hari kedua sampai dengan hari terakhir perlakuan sebelum dilakukan dekapitasi.

Pemberian perasan *Momordica charantia* dilakukan dengan cara menghaluskan buah pare segar dengan alat *juicer*. Kemudian ditentukan dosis

pemberian melalui dosis konversi yaitu; pada kelinci dengan berat 1,5 kilogram sebesar 6 cc/kg berat badan, maka bila dikonversi pada tikus dengan berat 200 gram didapatkan 0,25 dari 6 cc/kg berat badan yaitu 1,5 cc/kg berat badan.¹⁵ Pemberian perasan pare ini diberikan dua jam setelah pemberian pakan standar plus diet kuning telur, dan diberikan satu hari sekali satu dosis.

4.7. Prosedur Pemeriksaan dan Pengukuran

Teknik pemeriksaan dan penghitungan kadar lipid dengan cara; 1) mengambil darah dengan tabung mikrohematokrit lewat *plexus retro-orbitalis* sebanyak 0,5 sampai 1,0 cc, 2) pemeriksaan enzimatik dengan metode GPO-PAP untuk pengukuran kadar trigliseridaa, metode CHOD-PAP untuk pengukuran kadar kolesterol total, HDL dan LDL, 3) penentuan intensitas kadar lipid secara fotometrik.

Teknik penghitungan sel busa dan pengukuran ketebalan aorta abdominalis dengan cara; tikus didekapitasi, dan diambil aorta abdominalis sepanjang 5 cm (dibawah *arteri renalis* sampai percabangan *arteri iliaca* termasuk *bifurcatio aorta*), kemudian potongan aorta abdominalis dilakukan potong beku dengan *cryostat* dan dipotong setebal 4 mikron, diletakkan di atas kaca obyektif dan dipulas dengan *HE*, ditutup dengan kaca penutup. Sel busa dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x, dihitung jumlah sel busa di tunika intima dan media pada penampang melintang aorta. Penghitungan sel busa pada penelitian ini menggunakan pewarnaan HE.

Pengukuran ketebalan aorta abdominalis ditentukan dengan cara; 1) pemrosesan jaringan dan pembuatan blok *paraffin*, sesuai standar pemeriksaan

histopatologi, 2) prosedur pengecatan HE, 3) pemeriksaan dengan mikroskop dengan pembesaran 400x (okuler 10x, obyektif 40x), 4) mengukur ketebalan penampang lintang aorta, dari tunika intima sampai tunika adventitia pada 8 zona (jam 12.00, 13.30, 15.00, 16.30, 18.00, 19.30, 21.00 dan 22.30), cara penghitungannya yaitu (jumlah skala : 400) X 1000 mikron, atau skala X 2,5 mikron, ketebalan aorta dikonversi dalam persen (dengan membandingkan ukuran ketebalan aorta dengan kelompok kontrol), menghitung nilai mean dan SD, untuk mendapatkan nilai ketebalan normal. Bila lebih dari normal, disebut dinding menebal. Pengukuran ketebalan aorta dilakukan pada delapan zona, dan dihitung berapa persen bagian yang menebal (pada penampang melintang aorta).

4.8. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama sembilan minggu, dari bulan Maret sampai Mei 2005. Pemeliharaan hewan coba, induksi aterosklerosis dan pemberian diet kuning telur, perasan pare dilakukan di Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM Yogyakarta. Pengukuran kadar lipid dilakukan di laboratorium PAU Bagian Biotek UGM. Serta prosesing jaringan dan pewarnaan dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi FK UGM. Penghitungan jumlah sel busa dan ketebalan dinding aorta dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UNDIP Semarang.

4.9. Cara Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan adalah profil lipid, meliputi kolesterol total, kolesterol HDL, kolesterol LDL, dan trigliserida. Selain itu juga dikumpulkan

data jumlah sel busa dan ketebalan dinding aorta abdominalis. Data-data dikumpulkan melalui dua tahap yaitu pada akhir minggu ke-3 perlakuan dan akhir minggu ke-6 sebagai berikut;

Tahap pertama:

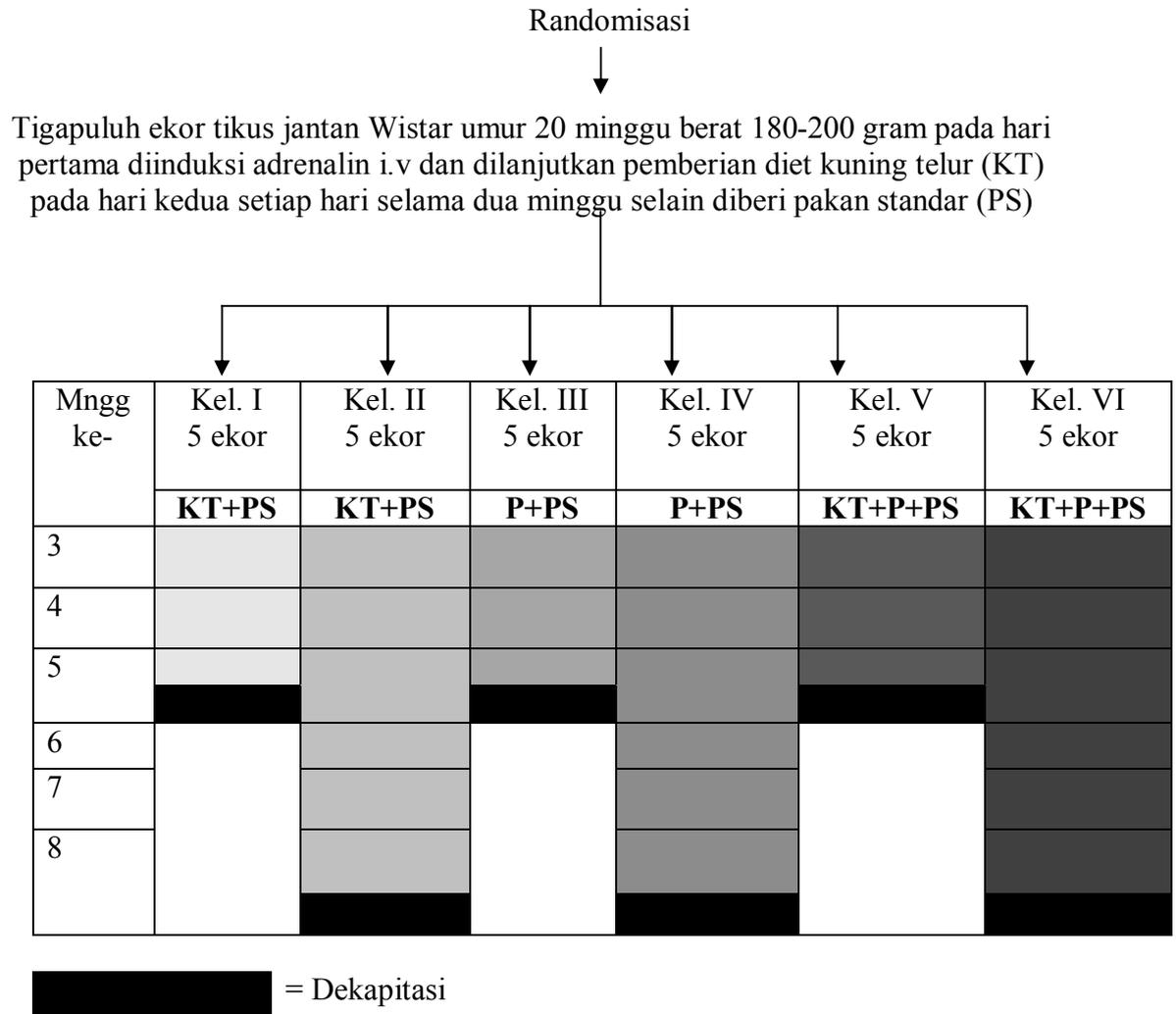
- a. Kelompok I, kelompok kontrol perlakuan (P1) yang diberi pakan standar dan diet kuning telur selama tiga minggu, kemudian didekapitai pada akhir minggu ke-3 perlakuan.
- b. Kelompok III, kelompok perlakuan (P3) yang diberi pakan standar, dan perasan pare selama tiga minggu, didekapitasi pada akhir minggu ke-3 perlakuan.
- c. Kelompok V, kelompok perlakuan (P5) yang diberi pakan standar, diet kuning telur dan perasan pare selama tiga minggu, didekapitasi pada akhir minggu ke-3 perlakuan.

Tahap kedua:

- a. Kelompok II, kelompok kontrol perlakuan (P2) yang diberi pakan standar dan diet kuning telur selama enam minggu, kemudian didekapitasi pada akhir minggu ke enam perlakuan.
- b. Kelompok IV, kelompok perlakuan (P4) yang diberi pakan standar, dan perasan pare selama enam minggu, didekapitasi pada akhir minggu ke enam perlakuan.
- c. Kelompok VI, kelompok perlakuan (P6) yang diberi pakan standar, diet kuning telur dan perasan pare selama enam minggu, didekapitasi pada akhir minggu ke enam perlakuan.

Pengamatan dilakukan pada akhir minggu ketiga perlakuan, untuk melihat efek pemberian perasan pare dengan perasan pare plus diet kuning telur terhadap profil lipid serum dan perkembangan lesi aterosklerosis pada dinding aorta abdominalis pada lesi awal, sedangkan pengamatan pada akhir minggu keenam perlakuan adalah untuk melihat efek pemberian perasan pare dengan perasan pare plus kuning telur terhadap profil lipid dan lesi aterosklerosis tahap lanjut.

4.10. Alur Penelitian



Catatan:

1. Kelompok I dibanding III, II dibanding IV, III dibanding V, menjawab tujuan khusus 1
2. Kelompok III dibanding IV, V dibanding VI, menjawab tujuan khusus 2
3. Kelompok III dibanding V, IV dibanding VI, menjawab tujuan khusus 3

4.11. Analisis Data

Data-data yang telah terkumpul yaitu profil lipid serum (kadar kolesterol total, kolesterol HDL, kolesterol LDL dan trigliseridaa), jumlah sel busa dan ketebalan dinding aorta abdominalis pada masing-masing kelompok, kemudian

dilakukan *editing*, *coding* dan *entering* ke dalam file komputer program SPSS versi 12.0, selanjutnya dilakukan *cleaning* dan *organizing* untuk persiapan analisis data.

4.11.1. Analisis deskriptif

Dilakukan analisis univariat dengan menampilkan gambaran data, mean, median dan standar deviasi dari masing-masing variabel dalam bentuk tabel dan diagram *boxplot*, dengan menggunakan program olah data SPSS versi 12.0.

4.11.2. Analisis statistik inferensial

Uji normalitas *Shapiro-Wilk* digunakan disebabkan $n < 50$. Pada penelitian ini hasil yang didapatkan distribusi data hampir seluruhnya tidak normal, maka uji statistik analisis inferensial untuk membandingkan beda mean profil lipid serum (kadar kolesterol total, kolesterol HDL, kolesterol LDL dan trigliserida), jumlah sel busa dan ketebalan dinding aorta abdominalis pada masing-masing kelompok menggunakan analisis non parametrik *Kruskal-Wallis*. Sedangkan untuk mengetahui beda mean dua kelompok yang akan dibandingkan, dilanjutkan dengan analisis non parametrik *Mann-Whitney U test*.

