

BAB III

METODE PENELITIAN

2.8 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup keilmuan yang dipakai pada penelitian ini adalah ilmu histologi, patologi anatomi, dan farmakologi.

2.9 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Pembuatan ekstrak brokoli dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro. Pembuatan spesimen dan pemeriksaan histopatologi aorta dilaksanakan di Sentra Patologi Anatomi Akurat Semarang. Penelitian dilakukan selama 2 bulan yaitu pada bulan Mei hingga Juni 2018.

2.10 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *post test only control group design* yang menggunakan binatang coba sebagai obyek percobaan.

2.11 Populasi dan Sampel Penelitian

3.5.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah tikus wistar jantan.

3.5.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian diambil dari populasi secara acak dan memenuhi kriteria inklusi, eksklusi dan *drop out*.

3.4.2.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus strain wistar
2. Umur 2-3 bulan
3. Berat badan rata-rata 150-200 gram
4. Tikus dalam keadaan sehat dan aktif

3.4.2.2 Kriteria Eksklusi

Tidak terdapat kriteria eksklusi.

3.4.2.3 Kriteria *Drop Out*

Sampel yang mati selama penelitian

3.5.3 Besar Sampel

Penentuan besar sampel penelitian mengacu pada *Institutional Animal Care and Use Comitee Guidebook* dan *World Health Organization (WHO)* yaitu sebanyak minimal 5 ekor hewan coba tiap kelompok perlakuan dan menganut prinsip 3R (*Replacement, Reduction, and Refinement*). Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus dalam setiap kelompok untuk mengantisipasi adanya tikus yang *drop out* atau mati. Oleh karena itu, karena penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan maka jumlah sampel yang digunakan adalah 30 ekor tikus.

3.5.4 Cara Sampling

Pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*) untuk menghindari bias karena faktor umur dan berat badan. Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel diambil dari tikus Wistar yang sudah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sehingga dianggap cukup homogen.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah derajat sel busa, peradangan, dan perdarahan aorta tikus wistar.

3.5.2 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol brokoli.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1	Ekstrak brokoli	Ekstrak brokoli adalah ekstrak dari seluruh bagian bunga brokoli (<i>Brassica oleracea</i> L.Var <i>italic</i>) yang diperoleh dengan metode maserasi. Dosis yang diberikan adalah 250 mg/kgBB pada kelompok P1, 500 mg/kgBB pada kelompok P2, dan 750 mg/kgBB pada kelompok P3.	Mg	Nominal
2	Histopatologi aorta	Pengukuran dilakukan dengan mengamati derajat sel busa, peradangan dan perdarahan. Derajat		Ordinal

tersebut dibagi menjadi 3 kategori yaitu ringan, sedang, berat.

- Derajat ringan : terdapat kelainan pada < 30% lapangan pandang
 - Derajat sedang : terdapat kelainan pada 30-50% lapangan pandang
 - Derajat berat : terdapat kelainan pada > 50% lapangan pandang
-

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Alat dan Bahan

3.7.1.1 Alat

- 1) Alat untuk pemeliharaan tikus wistar adalah bak plastik, penutup kawat, botol air minum, tempat makan, label, dan timbangan.
- 2) Alat untuk pembuatan ekstrak brokoli adalah *blender*, ayakan 30 mesh, timbangan, pengaduk, labu Erlenmeyer, dan *rotary evaporator*.
- 3) Alat untuk menyonde ekstrak brokoli adalah *handscoon*, masker, *beker glass*, pengaduk, dan spuit sonde.
- 4) Alat untuk menginduksi hiperlipidemia adalah *handscoon*, masker, *beker glass*, pengaduk, dan spuit sonde.

- 5) Alat untuk pengambilan aorta tikus adalah handscoon, toples, kapas, papan fiksasi, dan minor set.
- 6) Alat untuk pembuatan preparat adalah wadah cetakan, *tissue processor*, *embedding center*, *microtom*, *waterbath*, kaca objek, *deck glass* dan label.
- 7) Alat untuk pengamatan hasil preparat hati tikus digunakan mikroskop cahaya.

3.7.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah brokoli, pakan tinggi lemak (minyak babi 2ml/ ekor/ hari), *neutral buffer formalin (NBF)* 10%, paraffin, xylol, alcohol 96%, *Haematoxylin Eosin (HE)*.

3.7.2 Jenis Data

Jenis data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer hasil penelitian dengan melihat histopatologi aorta tikus Wistar pada setiap kelompok perlakuan.

3.7.3 Cara Kerja

3.7.3.1 Persiapan Hewan

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dengan jenis kelamin jantan yang berumur 2-3 bulan. Berat badan tikus rata-rata 150-200 g. Kriteria tikus sehat ditandai dengan gerakan aktif, bulu bersih, mata jernih dan belum pernah mendapat pengobatan sebelumnya. Sebelum dilakukan percobaan, setiap tikus yang ada pada kelompok diaklimatisasi selama 7 hari dengan diberi pakan minum standar *ad libitum*.

3.7.3.2 Pembuatan Ekstrak Brokoli

Bunga brokoli dipisahkan dari bagian tangkainya dan diiris tipis, kemudian dikeringkan tanpa terkena sinar matahari langsung. Brokoli yang sudah kering dihaluskan dengan *blender* hingga menjadi serbuk. Serbuk diayak menggunakan mesh hingga didapatkan serbuk yang halus dan ditimbang. 250 gram serbuk brokoli halus dimaserasi selama 48 jam dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Selanjutnya, ekstrak ditampung di labu erlenmeyer kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 25-30°C

3.7.3.3 Perlakuan Hewan Coba

Tiga puluh ekor tikus Wistar dibagi ke dalam 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus, dengan pembagian sebagai berikut:

- 1) K1 : Tikus wistar diberi diet standar selama 17 hari.
- 2) K2 : Tikus Wistar diberi diet tinggi lemak (minyak babi 2ml/ ekor/ hari) selama 10 hari, kemudian diberi diet standar selama 7 hari.
- 3) Tikus Wistar diberi diet tinggi lemak (minyak babi 2ml/ ekor/ hari) selama 10 hari, kemudian diberi diet standar dan ekstrak etanol brokoli 250mg/kgBB selama 7 hari.
- 4) P2 : Tikus Wistar diberi diet tinggi lemak (minyak babi 2ml/ ekor/ hari) selama 10 hari, kemudian diberi diet standar dan ekstrak etanol brokoli 500mg/kgBB selama 7 hari.
- 5) P3 : Tikus Wistar diberi diet tinggi lemak (minyak babi 2ml/ ekor/ hari) selama 10 hari, kemudian diberi diet standar dan ekstrak

etanol brokoli 750mg/kgBB selama 7 hari.

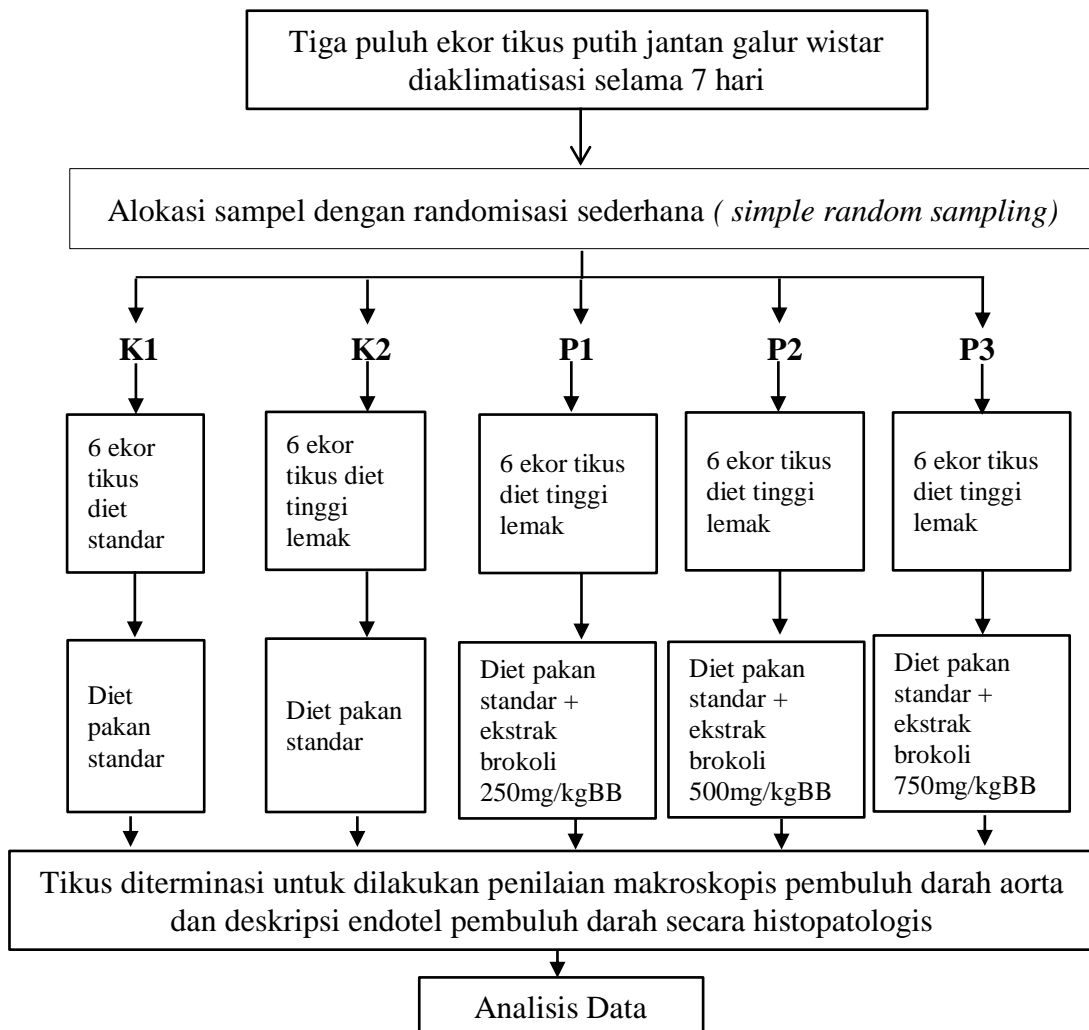
3.7.3.4 Pembuatan Preparat Histopatologis

Pengambilan sampel organ dilakukan pada hari ke-17 setelah seluruh perlakuan selesai diberikan. Tikus dibedah untuk pengambilan arcus aorta. Organ disimpan dalam larutan NBF 10% kemudian dibuat preparat histopatologi dengan pewarnaan HE untuk pemeriksaan mikroskopis.

3.7.3.5 Pengamatan Preparat Histopatologi

Penilaian histopatologis endotel pembuluh darah aorta difokuskan pada pengamatan derajat sel busa, derajat peradangan, dan derajat perdarahan pada tunika intima dan tunika media.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Data yang terkumpul telah diolah terlebih dahulu melalui proses *editing*, *coding*, *entrying*, dan *cleaning* data. Lalu data dianalisis secara statistik dengan program komputer. Analisis deskriptif hasil penelitian berupa proporsi untuk masing-masing kelompok. Uji hipotesis yang digunakan adalah uji *Kruskall-wallis* karena kelompok-kelompok pengukuran dalam penelitian ini tidak berpasangan dan berjumlah lebih dari 2 kelompok, serta variabel-variabel dalam

penelitian ini berskala kategorikal. Jika hasil uji *Kruskall-wallis* bermakna, maka akan dilanjutkan uji *Mann-whitney*. Nilai p dianggap bermakna apabila $p < 0,05$ dengan interval kepercayaan 95%.

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance telah didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP dr Kariadi Semarang dengan nomor 62/EC/H/FK-RSDK/V/2018 pada tanggal 4 Juni 2018.