

BAB III.

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk menilai perbedaan ketebalan pembuluh darah aorta abdominal pada semua kelompok tikus kontrol dan kelompok tikus perlakuan. Perlakuan yang diberikan kepada tikus adalah dengan menjadikan tikus hiperkolesterolemia dengan induksi pakan tinggi lemak dosis bertingkat dengan menggunakan mentega putih diberikan dengan cara disonde. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *post test control* desain sehingga dapat melihat perbedaan pembuluh darah aorta abdominal pada tikus galur wistar pada setiap kelompok.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian eksperimental ini dilakukan dari bulan November hingga pertengahan Februari 2017 yang bertempat di :

1. Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia untuk melakukan persiapan, perlakuan, terminasi dan mengambil sampel.
2. Laboratorium Universitas Islam Indonesia membuat preparat histologi
3. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia untuk menghitung ketebalan pembuluh darah aorta abdominalis tikus.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah bahan biologi tersimpan berupa organ aorta abdominalis tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang sebelumnya telah mendapat perlakuan dan didapat dari penelitian Pramaningtyas dan

Nurmasitoh (2016), dengan judul Efek Pemberian Mentega Putih Berbagai Dosis Sebagai Induksi Hiperkolesterolemia Terhadap Profil Lipid dan Perlemakan Sel Hepar Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*).

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah 24 organ aorta abdominalis tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*). Tikus Wistar yang digunakan saat penelitian berusia sekitar 2 bulan dan memiliki berat 170-250 gram. Tikus Wistar di bagi menjadi 2 kelompok utama sesuai dengan perlakuannya, yaitu:

1. Kelompok kontrol, terdapat :
 - a. K(-) yaitu kelompok kontrol negative yang diberi pakan standar selama 6 minggu.
 - b. K(+) yaitu kelompok kontrol yang diberi pakan tinggi lemak selama 6 minggu.
2. Kelompok yang diberi perlakuan

dibagi menjadi 2 kelompok sesuai dengan dosis pemberian pakan tinggi lemak, yaitu :

 - a. P1 (Kelompok perlakuan dengan sonde 4g mentega putih dan 20g pakan standar 1 : 5) selama 6 minggu.
 - b. P2 (Kelompok perlakuan dengan sonde 2g mentega putih dan 20g pakan standar 1 : 10) selama 6 minggu.

Jumlah hewan coba dapat diperoleh menggunakan rumus Federer $(n-1)(t-1) \geq 15$ dengan $n =$ jumlah sampel tiap perlakuan, sedangkan p untuk jumlah perlakuan.

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

$$(n-1)3 \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan rumus Federer tersebut didapatkan jumlah sampel tiap perlakuan adalah ≥ 6 sehingga total hewan coba yang diperlukan untuk penelitian ini adalah 24 ekor tikus galur wistar. Teknik pengambilan sampel yaitu dengan cara menggunakan teknik randomisasi (acak). Pertama, tikus di beri label dari 1 sampai 6. Lalu, membuat tabel kosong berisikan kolom yang berjumlah semua sampel penelitian yang terbagi dalam 4 kelompok, kemudian secara acak memasukan tikus tersebut ke dalam suatu kelompok dan memberi label pada tikus tersebut sesuai dengan kategori kelompok. Untuk cadangan setiap kelompok ditambah 1 ekor tikus sehingga total sampel setelah ditambah cadangan adalah 28.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel bebas

Penelitian eksperimental ini variabel bebas adalah dosis pakan tinggi lemak yaitu pakan yang dicampur dengan mentega putih. Dosisnya adalah 1:5 dan 1:10.

3.4.2 Variabel terikat

Penelitian eksperimental ini variabel terikat adalah ketebalan pembuluh darah aorta abdominal tikus pada setiap kelompok.

3.5 Definisi Operasional

a. Mentega putih

Mentega putih yang digunakan merupakan mentega putih yang telah dipanaskan menggunakan kompor listrik dengan suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$ dan diberikan pada hewan coba menggunakan sonde dengan dosis sesuai setiap kelompok perlakuan yaitu 1:5 (20%) atau 1:10 (10%). Pelakuan dilakukan setiap pagi selama ± 6 minggu.

b. Pakan Standar

Pakan standar adalah pakan normal standar untuk tikus dengan komposisi sesuai referensi yang diberikan kepada kelompok tikus kontrol negatif (K-), kelompok perlakuan 1 (P1), dan kelompok perlakuan 2 (P2). Pakan standar dipesan dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada. Pakan standar yang dipakai untuk tikus adalah *brailler-II pellet* (BR-II) yang mengandung jagung, bungkil kedelai, *wheat pollard*, bungkil kelapa, tepung ikan, tepung daging, tepung beras, tapioka, minyak kelapa, dan minyak ikan premix (Zilmi, 2011) (Murnah, 2011).

c. Pakan Tinggi Lemak Standar

Pakan tinggi lemak standar adalah pakan yang diberikan pada kelompok kontrol positif (K+) dan mengandung komposisi lemak yang tinggi, dibuat sesuai referensi sehingga mampu menginduksi hiperkolesterolemia dan dipesan dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada. Komposisi pakan tinggi lemak standar (*high fat diet*) yaitu *casein purified high nitrogen* (18%), sukrosa (29%), minyak biji kapas (45%), *brewers yeast U.S.P* (4%), campuran garam (4%).

d. Ketebalan Dinding Aorta Abdominalis

Ketebalan dinding aorta abdominalis merupakan pengukuran penampang melintang 8 zona dari tunika intima hingga tunika media dalam satuan μm yang diberikan pewarnaan HE yang kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya dengan merk Olympus dengan perbesaran 10x okuler dan 40x objektif (400x) yang dilengkapi dengan optilab.

3.6 Instrumen Penelitian (Alat dan Bahan)

a. Alat :

1. Sarung tangan
2. *Tissue processor automatic* merk *Sakura* atau *Sandon Varistain 24-4* untuk pemrosesan jaringan
3. Alat untuk pengeblokan
 - a) Kompor pemanas dan oven untuk stok paraffin

- b) Panci pemasak paraffin
 - c) Cawan wadah paraffin
 - d) Pinset, tungku pemanas
 - e) Cetakan blok *stenlissteel* / kuningan *letter L*
 - f) *Casset* blok dan pisau untuk men-*triping* blok
 - g) Lampu spiritus
 - h) Seng plat untuk memasang nomer registrasi
4. Alat untuk pemotongan dengan mikrotom
 - a) Mikrotom *Thermo spesific*
 - b) *Water bath*
 - c) Kaca objek
 - d) Pensil kaca
 - e) Kaca pembersih
 - f) Jarum
 - g) Map karton
 5. Alat untuk inkubasi
 - a) *Hot plate*
 - b) Kertas merang
 6. Alat untuk pewarnaan otomatis *Shandon Varistain 24-4*
 7. Mikroskop cahaya merk *Olympus*
 8. Optilab
- b. Bahan
1. Mentega putih
 2. Pakan tinggi lemak
 3. Pakan standar
 4. Sekam
 5. Air
 6. Cairan formalin *buffer* 10% untuk fiksasi
 7. Alkohol
 8. Bahan untuk pemrosesan jaringan :

- a) Cairan formalin *buffer* 10%
 - b) Alkohol 70%, 80%, 95%, Absolut I, absolut II, absolut III
 - c) *Xylol* I, II, III
 - d) Parafin Cair I, II
9. Bahan untuk pemotongan dengan mikrotom
- a) Putih telur dan gliserin 1 : 1
 - b) *Tymol*
10. Bahan untuk pengecatan
- a) Larutan Mayer Hetatoksilin
 - b) Larutan Eosin
 - c) Alkohol 100%, 95%, 80%, 70%
 - d) *Xylol*
 - e) Entelan

3.7 Tahap dan Alur Penelitian

3.7.1 Terminasi tikus

Tikus pada penelitian Pramaningtyas dan Nurmasitoh (2016), diterminasi dengan cara menggunakan anestesi ketamin 1000 mg kemudian dilakukan pengambilan aorta adominalis pada setiap tikus. Aorta abdominalis dipotong dari bawah difragma sampai sebelum percabangan arteri iliaka. Aorta abdominalis kemudian disimpan dalam Cairan formalin *buffer* 10% untuk persiapan pembuatan preparat histologis di Laboratorium Riset FK UII UGM.

3.7.2 Pembuatan preparat histologi

Teknik pengambilan sampel histologi yaitu dengan cara mengambil aorta abdominalis dari tikus yang sebelumnya sudah diterminasi dan tulang rusuknya dibuka untuk mengambil bagian aorta abdominalisnya. Setelah pengambilan aorta abdominalis, sampel difiksasi selama 24 jam dalam larutan formalin dengan larutan penyangga 10% (Okuyucu *et al.*, 2015). Cairan formalin *buffer* 10% mengandung formaldehyde 40%, *sodiumphospate monobasic*, *sodium phosphate dibasic*, dan akuades. Setelah direndam dalam larutan formalin *buffer* 10% selama

24 jam, organ aorta abdominalis direndam menggunakan alkohol 70%. Aorta abdominalis kemudian dikirim ke bagian di Lab Riset FK UII untuk dilakukan pembuatan preparat histologi. Bagian Lab Riset FK UII setelah menerima jaringan maka akan melakukan beberapa proses hingga terbentuk preparat yang diinginkan. Menurut Yunadir (2008), proses yang harus dilakukan adalah :

a. Pemeriksaan makroskopis

Pemeriksaan makroskopis dilakukan oleh dokter ahli patologi anatomi atau residen dan dibantu oleh petugas laboratorium.

1. Jaringan dikeluarkan dari wadah dan ditempatkan pada tempat terbuka
2. Mengidentifikasi ukuran, bentuk, warna luar dan dalam, konsistensi dll
3. Dokter PA mengambil satu atau beberapa kope dari satu atau beberapa tempat
4. Kope yang diambil masing-masing ukurannya 2 x 1,5 x 0,2-0,3 cm. apabila jaringan sedikit atau pecah belah \pm 3 cc diambil semua.

b. Pemrosesan jaringan

Pemrosesan jaringan membutuhkan waktu \pm 18,5 jam menggunakan alat *tissue processor automatic* yaitu melalui proses sebagai berikut :

1. Fiksasi

Fiksasi dilakukan dengan cara pemberian formalin *buffer* 10%. Hal ini dilakukan sekiranya pada proses fiksasi setelah terminasi tikus belum sempurna. Fiksasi dilakukan oleh alat ini sekitar 2 jam. Fiksasi yang sempurna akan mempermudah kerja alkohol saat proses dehidrasi dan mengurangi resiko infeksi bagi laboran. Fiksasi dilakukan dengan cara denaturasi dan presipitasi protein sehingga membentuk gambaran jala atau spon yang dapat menjaga keutuhan jaringan.

2. Dehidrasi

Dehidrasi dilakukan untuk menghilangkan kandungan air yang ada dalam jaringan dengan cara memberikan alkohol dengan konsentrasi 70% selama 1,5 jam, 80% selama 1,5 jam, 95% selama 1,5 jam, alkohol absolut I

selama 1 jam, alkohol absolut II selama 1,5 jam, dan alkohol absolut III selama 2 jam.

3. *Clearing*

Clearing bertujuan untuk menghilangkan kadar alkohol yang terdapat dalam preparat karena sebelumnya pada saat proses dehidrasi menggunakan alkohol. Selain melunturkan alkohol proses ini berfungsi untuk menjernihkan preparat dan sebagai daya perantara masuknya paraffin ke dalam rongga-rongga jaringan. Preparat diberikan *xylol* I selama 1 jam, *xylol* II selama 1,5 jam, dan *xylol* III selama 1,5 jam.

4. Infiltrasi paraffin

Infiltrasi paraffin cair berfungsi untuk mengisi rongga-rongga atau pori-pori jaringan. Infiltrasi paraffin cair I selama 1,5 jam dan infiltrasi paraffin II selama 2 jam pada suhu 57-59°C. Pada proses infiltrasi tidak boleh berlangsung lebih dari 4 jam dan suhu tidak boleh lebih dr 60°C karena jaringan menjadi keras dan saat pemotongan dengan mikrotom hasilnya pecah-pecah atau bergelombang, dan saat pengecatan preparat mungkin lepas dari *object glass*.

c. Pengeblokan / *embedding*

Jaringan yang telah diproses segera dimasukkan ke dalam cetakkan blok yang sebelumnya sudah diisi dengan paraffin cair dan nomer registrasinya ditempelkan di bagian pinggir. Setelah 20 menit cetakan dilepas dan nomor registrasinya diganti dengan yang permanen. Alat yang digunakan untuk pengeblokan adalah *leica* EG1160.

d. Pemotongan dengan mikrotom

Jaringan yang sudah selesai dilakukan pengeblokan/*embedding*akan terbentuk blok dan didinginkan dengan diberi es batu atau dimasukkan ke dalam plastik yang sebelumnya diberi air dan dimasukkan *freezer* ± 15 menit sebelum dilakukan pemotongan dengan mikrotom. Blok dijepitkan pada mikrotom dan dengan kemiringan ± 30° terhadap blok paraffin setebal ± 2-5 mikron blok dipotong dengan pisau mikrotom yang dapat berupa pisau *disposable, cutter*

atau *knife*. Pemotongan dengan mikrotom ini menghasilkan potongan yang berbentuk pita. Pita kemudian dimasukkan ke dalam *waterbath* yang telah diisi dengan air dan dihangatkan dengan suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Pita yang dimasukkan ke dalam *waterbath* dapat direntangkan dengan cara memberikan alkohol 50 % di dalam *waterbath* sehingga menurunkan tegangan permukaan air. Pita kemudian diambil dan diletakkan ke *object glass* dan diberi nomer sesuai registrasi dengan menggunakan pensil setelah itu dilakukan inkubasi.

e. Inkubasi

Inkubasi dilakukan untuk menghilangkan air yang terbawa dari proses pemotongan atau pita sehingga jaringan dapat menempel dengan kuat pada *object glass*. Preparat diinkubasi ± 15 menit diatas *hot plate* yang dialasi kertas merang dengan suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$.

f. Pengecatan dengan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Pengecatan menggunakan HE adalah cat paling umum yang digunakan dalam pewarnaan histopatologi. Proses pengecatan histologi yaitu :

1. Deparafinisasi

Deparafinisasi bertujuan untuk melarutkan paraffin yang terdapat dalam preparat. Preparat dimasukkan ke dalam *xylol* I, II, III yang masing-masing selama 3 menit.

2. Rehidrasi

Rehidrasi dilakukan dengan cara memasukkan preparat ke dalam alkohol 100%, 95%, 80%, 70% masing-masing selama 2 menit. Rehidrasi bertujuan untuk menghilangkan *xylol* dan memasukkan air ke dalam preparat.

3. Air mengalir

Preparat diairi dengan air mengalir selama 3 menit supaya sisa cat atau cairan yang terbawa sebelumnya larut.

4. Pengecatan inti

Selama 7 menit preparat dimasukkan ke dalam larutan mayer hematoksilin untuk memberikan warna biru pada inti sel.

5. Air mengalir

Selama 7 menit preparat diiri alir mengalir.

6. *Counter stain*

Selama setengah menit preparat dimasukkan ke dalam larutan eosin untuk memberikan warna merah pada sitoplasma, jaringan ikat dan lainnya.

7. Preparat masuk ke air

Preparat dimasukkan/dicelupkan ke air dalam wadah I,II,III masing-masing 3 celup.

8. Dehidrasi

Dehidrasi dilakukan dengan tujuan mengeluarkan air yang terbawa oleh preparat dengan memberikan alkohol 70%, 80%, 95%, 100%. Setelah itu dilap dengan kasaa di sekitar preparat.

9. *Clearing*

Preparat dimasukkan ke dalam xylol I,II masing-masing 2 menit bertujuan untuk melarutkan alkohol yang terbawa oleh preparat dan memberikan warna jernih pada preparat.

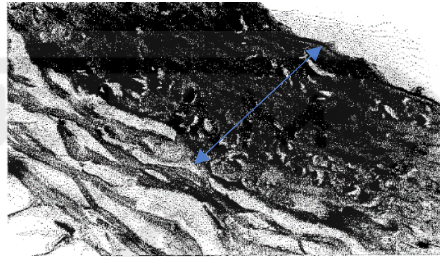
10. *Mounting*

Preparat diberikan 1 tetes entelan yang bersifat permanen sehingga memberikan preparat berwarna jernih dan tidak kusam serta mengawetkan preparat.

3.7.3 Pengukuran ketebalan aorta abdominalis

Pengukuran ketebalan aorta menggunakan mikroskop cahaya di lengkapi dengan optilab. Ketebalan aorta kemudian dilihat oleh seorang ahli Patologi Anatomi yang tidak diberikan informasi mengenai pembagian kelompok pada aorta abdominalisnya. Hasil pengukuran ketebalan aorta abdominalis ditulis dalam satuan μm .

Untuk menghitung ketebalan normal dilakukan dengan cara menghitung mean dari kelompok kontrol, kemudian kelompok lain dibandingkan dengan kelompok kontrol sehingga dinyatakan terjadi penebalan apabila hasil pengukuran melebihi angka normal (Okuyucu *et al.*, 2015).



Gambar 7. Pengukuran tunika intima dan media (Sampurna, 2003).

Pengukuran ketebalan aorta abdominalis dilakukan pada potongan melintang dan dilihat dari 8 zona yaitu arah jam 12.00, 13.30, 15.00, 16.30, 18.00, 19.30, 21.00, 22.30 kemudian hasilnya diambil rata-rata dari kedelapan zona tersebut (Sampurna, 2003).



Gambar 6. Alur skema penelitian

3.8 Analisis data

Analisis data eksperimen menggunakan program computer SPSS dan untuk mengukur ketebalan dinding aorta abdominal menggunakan uji ANOVA. Sebelum melakukan uji ANOVA, data yang diperoleh diperiksa normalitasnya menggunakan uji Saphiro Wilk karena $n < 50$, apabila datanya didapatkan tidak normal, dilakukan uji Kruskal-wallis yang dinyatakan bermakna apabila $p < 0,05$.

3.9 Etika Penelitian

Pada penelitian akan diusahakan untuk dilakukan langkah-langkah etika penelitian yaitu:

- a. Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan jujur baik dari pengambilan data, pengambilan pustaka, perlakuan hewan coba, analisis data, maupun kegagalan dan keberhasilan penelitian.
- b. Protokol perlakuan hewan coba telah disetujui oleh komisis etik dengan persetujuan etik nomor 65/Ka.Kom.Et/70/KE/XI/2016. (terlampir)