

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan penelitian eksperimen yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003).

3.2 Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan *complete block design* atau Rancangan Acak Kelompok (RAK) (Sastrosupadi, 1977). Dengan perlakuan 1 dosis kontrol, 3 dosis pakan aterogenik kolesterol yang berbeda, dan perlakuan 4 jangka waktu berbeda. Pada penelitian ini variabel yang digunakan adalah:

1. Variabel Bebas: Dosis pakan aterogenik dan waktu pemberian.
2. Variabel Terikat: kondisi profil kadar kolesterol darah, luas dedahan kolesterol pada preparat histologi dari sistem kardiovaskular hewan uji.

Dosis lemak yang digunakan pada pakan aterogenik berupa ambang tinggi ($\frac{2}{3}$ bagian), tengah ($\frac{1}{2}$ bagian), dan rendah ($\frac{1}{4}$ bagian) dari kapasitas lambung mencit. Lemak yang digunakan adalah lemak gajih (lemak omentum perut) sapi. Volume lambung mencit dianalogikan sesuai dengan jumlah total maksimal pakan perhari yang habis dimakan oleh mencit, untuk mengetahuinya maka dilakukan pra-penelitian (Norris & Carr, 2013). Kemudian untuk menentukan komposisi lemak gajih yang digunakan dalam dosis pakan aterogenik adalah campuran gajih cair dari jumlah pakan maksimal per hari. Rentang waktu pemberian masing-masing dosis aterogenik: 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu, dan 4 minggu. Takaran lengkap untuk dosis pakan aterogenik dapat dilihat pada bab 3.5.1.3

Profil kadar total kolesterol diukur secara langsung menggunakan alat strip kolesterol, untuk kadar HDL dan Trigliserida diukur dengan metode presipitant, sedangkan kadar LDL diukur menggunakan rumus Friedwal. Luas dedahan kolesterol pada preparat histologi diukur mengenai ketebalan dinding tunika serta keberadaan plaque.

Terdapat 3 kelompok perlakuan dan 1 kontrol dengan 4 rentang waktu pemberian. Secara acak hewan dikelompokkan pada setiap kelompok kontrol dan

perlakuan dengan masing-masing kelompok dilakukan 3 kali pengulangan. Banyaknya pengulangan diperoleh dari rumus Federer berikut:

$$\begin{aligned} (\text{treatment}-1)(\text{replication}-1) &= 15 \\ (16-1)(r-1) &= 15 \\ 15r-15 &= 15 \\ 15r &= 30 \\ r &= 2 \text{ ekor} \end{aligned}$$

(untuk menambah keakuratan maka ditambah menjadi 3 ekor)

Dari hasil pengulangan tersebut maka dibuat pengaturan denah percobaan perlakuan secara acak (*Random*) sebagai berikut:

Tabel 3.1
Pengaturan Randomisasi Mencit

1 MII B	2 MIV C	3 MIII D	4 MI A	5 MI VB	6 MI D	7 MII C	8 MII A	9 MIII A	10 MI C	11 MII D	12 MIII B	13 MIV D	14 MI B	15 MIV A	16 MIII C
17 MIII D	18 MIV D	19 MI D	20 MII C	21 MIII A	22 MII A	23 MII IC	24 MI VB	25 MIII B	26 MI C	27 MII D	28 MIV A	29 MII B	30 MI VC	31 MI B	32 MI A
33 MI VA	34 MIII D	35 MI B	36 MIV D	37 MII C	38 MII IC	39 MII B	40 MI VB	41 MI A	42 MII A	43 MI D	44 MI C	45 MIII B	46 MII D	47 MIII A	48 MI VC

Keterangan

A=perlakuan dosis 1/4

B= perlakuan dosis 1/2

C= perlakuan dosis 2/3

D= Kontrol

M= Minggu ke-

1-48 = Nomor Mencit

Sehingga didapatkan peta kandang sebagai berikut:

Tabel 3.2
Peta Kandang Mencit

	D (Kontrol)			A			B			C		
MI	6	19	43	10	26	44	14	31	35	4	32	41
MII	11	27	46	7	20	37	1	29	39	8	22	42
MIII	3	17	34	16	23	38	12	25	45	9	21	47
MIV	13	18	36	2	30	48	5	24	40	15	28	33

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh organ jantung mencit dan sampel berupa darah dan jaringan histologis mencit.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama bulan Januari 2021-Maret 2021. Pembuatan pakan berlemak dilakukan di Laboratorium Fisiologi FPMIPA UPI Bandung. Pra-penelitian dan pemeliharaan dilakukan di rumah mencit Kebun Botani FPMIPA UPI dan sebagian di rumah peneliti. Pengambilan organ jantung dan pembuatan preparat histologi jantung dilakukan di rumah peneliti, sedangkan pengecekan profil kadar kolesterol dilakukan di Laboratorium Aretha Medika Bandung.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap Persiapan

3.5.1.1 Pra-Penelitian Penentuan Dosis Pakan Maksimal Perhari

Pada penelitian ini dilakukan pra-penelitian untuk menentukan dosis pakan maksimal perhari sebagai dasar untuk menentukan komposisi lemak berdasarkan volume lambung yang dapat menampung pakan. Volume lambung mencit dianalogikan sesuai dengan jumlah total maksimal pakan yang habis dimakan oleh mencit. Untuk itu, penentuan awal besar dosis pra-penelitian merujuk kepada rumus 20% Berat badan yang merupakan rerata pakan perhari mencit (Ristiyanto, 2005) yang selanjutnya dimodifikasi dengan menaikkan jumlahnya menjadi dosis I (1x 20%BB), II (2x 20%BB), III (3x 20%BB), dan IV (4x 20%BB) agar diketahui dosis yang paling stabil dan cocok untuk diterapkan dengan campuran lemak. Jenis pakan yang digunakan dalam pra-penelitian adalah pakan kelinci standar. Pra-penelitian ini dilakukan selama 2 minggu menggunakan 5 ekor mencit betina galur Swiss Webster berusia 3 bulan dengan rerata berat 20 g pada tiap dosisnya. Untuk minum diberikan secara *ad libitum*. Kemudian berat badan dan sisa pakan ditimbang setiap hari. Penentuan dosis pakan maksimal perhari dipilih pada rerata dosis yang habis dimakan tanpa sisa serta yang paling meningkatkan berat badan mencit.

3.5.1.2 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji merupakan mencit (*Mus musculus*) galur Swiss Webster betina berusia 3-4 bulan dengan berat rata-rata 20-25 g berjumlah 48 ekor yang diperoleh dari peternak mencit Di Pasar Burung Sukahaji, Bandung. Dipilih hewan betina dikarenakan menurut penelitian Hilakivi-Clarke *et al* (1996), bahwa keagresifan

mencit jantan dapat dipengaruhi oleh pemberian pakan berlemak dan kolesterol tinggi dan untuk menghindari keagresifan tersebut maka dipilih betina sebab lebih rendah tingkat keagresifannya. Selain itu, hewan jantan cenderung agresif bila ditempatkan bersama pejantan lainnya. Tingginya tingkat keagresifan ini dikhawatirkan memicu tingkat stress pada mencit dan memengaruhi nafsu makan mencit. Mencit diaklimatisasi selama 1 minggu dengan pakan standar kelinci dan minum disediakan secara *ad libitum*. Selama penelitian berlangsung, hewan ditempatkan dalam kandang plastik berukuran 40x30x13cm dengan tutup berupa ram kawat yang dibuat berjaring dan diletakkan pada tempat berintensitas cahaya normal dengan suhu sekitar 27°C dan kelembapan sekitar 65%.



Gambar 3.1
Kandang Mencit
(Dok. Pribadi, 2021)

3.5.1.3 Pembuatan Pakan Berlemak

Pakan aterogenik berkolesterol dibuat dengan cara mencampurkan pakan kelinci merek X dengan gajih sapi cair dengan rentang dosis sebagai berikut: (A) ambang batas bawah berupa 1/4 campuran gajih sapi dari dosis pakan maksimum per hari, (B) ambang batas tengah berupa 1/2 campuran gajih dari dosis pakan maksimum per hari, (C) ambang tinggi berupa 2/3 campuran lemak dari dosis pakan maksimal perhari, (D) Kontrol pakan standar tanpa campuran gajih. Dosis-dosis inilah yang dijadikan sebagai dosis percobaan dalam penelitian inti. Komposisi pakan kelinci data dilihat pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3
Komposisi Pakan Kelinci Merk X

Komposisi:
Protein 15 %
Serat kasar 16 %
Lemak 5 %
Abu 13 %
Kalsium 1,35 %
Fosfor 0,7

Komposisi ini mengandung maksimal sebanyak 15% protein, serat kasar 16%, dan lemak 5%.

Dosis pakan maksimal perhari diketahui dari pra-penelitian yakni didapat 3x 20% BB per ekor atau sekitar 15 g per ekor (dengan acuan berat badan seberat 25 g/ekor). Hasil lengkap dari pra-penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 3. Selanjutnya, didapatkan komposisi lemak berbanding pakan standar per ekor setiap hari untuk tiap dosisnya adalah: (A, dosis 1/4) 3,75 g : 11,25 g; (B, dosis 1/2) 7,5 g : 7,5 g; (C, dosis 2/3) 10 g : 5 g; (D, dosis kontrol) 0 g : 15 g untuk seluruh mencit selama penelitian berlangsung.

Lemak gajih dibuat padatan dengan cara melelehkan gajih, kemudian minyak hasil lelehan didiamkan hingga kaku. Gajih ditimbang sesuai dosis dan dicampurkan menjadi adonan dengan pelet kelinci yang sudah digerus dan juga air. Adonan ini kemudian dicetak ulang dengan gilingan daging. Untuk menghilangkan air dan mengembalikan tekstur yang padat, maka adonan dipanaskan dalam oven bersuhu 100°C hingga tekstur dirasa cukup. Pelet atherogenik ini disimpan dalam wadah plastik tertutup dan ditaruh pada ruangan gelap dan kering.

3.5.1.4 Alat dan Bahan yang digunakan

Terdapat beberapa alat yang digunakan pada penelitian ini. Untuk pengukuran kadar kolesterol total digunakan strip *autocheck cholesterol* sebanyak 60 strip, alat *autocheck 3 in 1 multi monitoring system* sebanyak satu set. Pengukuran presipitasi kadar trigliserida menggunakan reagen kit *ReiGed Diagnostics* dan kadar HDL menggunakan reagen kit *Glory Diagnostics*. Darah yang dianalisis ditampung dalam evendope berukuran 1,5 ml. Untuk pemeliharaan

mencit digunakan kandang dengan spesifikasi seperti pada bab 3.5.1.2. Digunakan kompor untuk melelehkan lemak gajih serta oven untuk mengeringkan adonan pakan aterogenik. Proses pembuatan dan pewarnaan preparat digunakan botol vial ukuran 20 ml sebanyak sembilan botol, rak preparat, timbangan analitik dengan spesifikasi HENHERR BL-H2, gelas sloki bertutup sebanyak 12 gelas, mikrotom tangan satu unit, mikroskop binokuler satu buah, alat bedah, cawan petri sebanyak empat buah, gelas ukur dan pipet ukur.

Adapun beberapa bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit betina galur Swiss Webster sebanyak 48 ekor sebagai hewan percobaan. Untuk pembedahan dan pembersihan organ jantung digunakan larutan NaCl 0,6%, pengawetan organ dengan formalin 4%. Pewarnaan preparat digunakan pewarna *Hematoxylin* dan Eosin 0,1%. Pembuatan preparat metode parafin digunakan alkohol bertingkat mulai dari alkohol 30%, alkohol 50%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, dan alkohol 100% teknis, xilol, parafin lunak (titik leleh 48°C), dan parafin keras (titik leleh 56°C) lalu entellan untuk menutup gelas cover pada preparat.

3.5.2 Tahap Perlakuan

3.5.2.1 Perlakuan Hewan Uji

Masing - masing hewan uji ditimbang dan diberi tanda. Setiap mencit ditaruh dalam kandang plastik berukuran 40x30x13cm dengan penutup berupa ram kawat berbentuk jaring yang dilapisi kayu pada bagian sisinya sesuai dengan peta kandang kelompok perlakuan. Dilakukan aklimatisasi selama 7 hari dengan pakan kelinci dan air secara *ad libitum*. Selanjutnya, mencit diberi pakan aterogenik setiap hari di pagi hari sesuai dosis dan waktu pemberian. Kandang mencit dibersihkan setiap pagi sebelum pemberian pakan dan ditimbang sisa pakan. Pada hari ke-8, 15, 22, dan 31 mencit ditimbang kemudian dibunuh dengan cara dislokasi leher terlebih dahulu dan diambil darah dari jantung dan *vena porta* hingga memenuhi 1 evendope berukuran 1,5 ml. Organ jantung diambil untuk keperluan pembuatan preparat jaringan. Setiap organ dicuci dengan larutan fisiologis NaCl 0,6% dan diawetkan dalam formalin 4%. Darah selanjutnya digunakan untuk pengukuran kadar HDL, Trigliserida, dan total kolesterol. Setiap

organ lainnya dibuang untuk memudahkan pengambilan organ dan darah untuk mencukupi wadah evendope.

3.5.2.2 Pengukuran Berat Badan dan Profil Kadar Kolesterol Darah

Berat badan mencit ditimbang pada pagi hari pada hari ke-8, 15, 22, dan 31 sesaat sebelum dibunuh. Profil kadar kolesterol darah didapatkan dengan analisis menggunakan beberapa metode. Untuk TC (total kolesterol) didapat dari pengecekan strip kolesterol oleh alat deteksi merek *Accucheck* dengan cara melukai ekor mencit dan mengusap strip ke sampel darah kemudian dimasukkan strip berisi darah ke alat deteksi. HDL dan trigliserida diperoleh secara analisis dengan metode CHOD-PAP dengan reagen kit komersial *Reiged Diagnostics* untuk trigliserida dan *Glory Diagnostic* untuk HDL. Darah dibuat serum dengan sentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Kemudian dilakukan analisis sesuai prosedur pada manual kit. Untuk pemeriksaan LDL didapat secara tidak langsung dengan perhitungan matematis menggunakan rumus Friedwal: $LDL = TC - HDL - (TG/5)$

3.5.2.3 Pembuatan Preparat Histologis Metode Hematoxylin-eosin

1. Fiksasi

Organ jantung diambil utuh kemudian di cuci dengan larutan NaCl 0.6% dan dimasukkan ke botol Formalin 4%. Organ dibiarkan dalam larutan selama 24 jam.

2. Dehidrasi

Organ diangkat dan dibersihkan dalam aquadest hingga tidak berbau formalin. Kemudian direndam ke dalam larutan alkohol bertingkat dimulai dari Alkohol 30% berlanjut ke alkohol 50%, 70%, 80%, 96% dimana masing-masing durasi rendam selama 1 jam dan tanpa jeda waktu antar pergantian (secara langsung).

3. Penjernihan

Organ dicelupkan ke dalam larutan xylol sekitar 2-3 menit hingga mulai transparan. Bila jaringan belum transparan maka jaringan direndam kembali dalam alkohol 96%.

4. Infiltrasi parafin

Organ dimasukkan ke dalam larutan xylol-paraffin lunak selama 5 menit, kemudian dipindahkan ke dalam parafin lunak saja selama 5 menit dan terakhir dipindahkan ke dalam parafin keras selama 10 menit.

5. Penanaman Jaringan dalam Block

Cetakan block dari kertas tebal berukuran 1 x 2 x 1 cm disiapkan. Parafin keras dicairkan terlebih dahulu kemudian di tuang hingga setengah permukaan cetakan. Organ kemudian di tanam dalam parafin tersebut dengan posisi horizontal. Terakhir parafin dituang kembali hingga memenuhi cetakan dibiarkan mengering di suhu ruang.

6. Pemotongan jaringan

Block parafin yang telah kering sebelumnya di buat menyerupai bangun trapesium untuk memperlihatkan pembatas antar irisan block dengan memotong kedua sudut atas dari block. Kemudian block dipasang pada *holder* di mikrotom. Mikrotom diatur ketebalan pemotongan 10 mikron, jika sudah mendekati organ diubah menjadi 6 mikron. Hasil irisan ditaruh diatas permukaan air hangat (45°-50°C).

7. Penempelan dan deparafinasi

Lembar irisan ditempel pada permukaan kaca objek yang sebelumnya telah dioles tipis dengan larutan albumin Mayer. Kaca objek ditaruh di atas *hot plate* bersuhu $\pm 55^{\circ}\text{C}$ sambil dipisahkan parafin dari jaringan. Kemudian jaringan direndam dalam larutan xylol selama 20 menit untuk menghilangkan sisa parafin.

8. Rehidrasi dan pewarnaan

Jaringan yang telah direndam dalam xylol selanjutnya di rendam dalam larutan alkohol bertingkat mulai dari 96%, 80%, 70%, 50%, 30%, ditambah aquadest. Masing - masing perendaman selama 3-5 detik. Selanjutnya pewarnaan inti dilakukan dengan cara jaringan dicelupkan dalam pewarna Haematoxylin Selama 3 detik dan dibilas oleh aquadest selama 5-10 menit. Untuk membedakan warna pada sitoplasma dilakukan diferensiasi warna

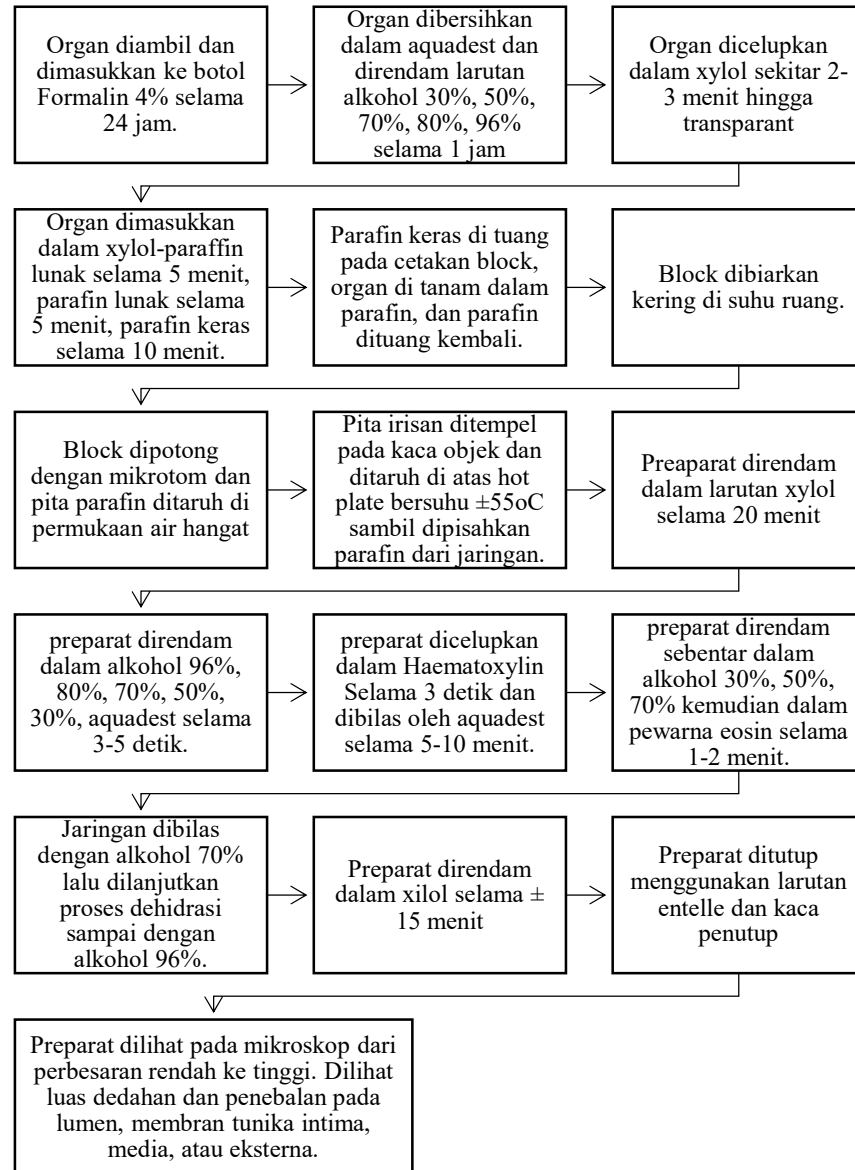
dengan merendam sebentar jaringan dalam alkohol 30%, 50%, 70% kemudian dalam pewarna eosin selama 1-2 menit.

9. Penutupan preparat

Jaringan yang telah diwarnai dibilas dengan alkohol 70% lalu dilanjutkan proses dehidrasi sampai dengan alkohol 96%. Setelah itu jaringan direndam dalam xilol selama \pm 15 menit untuk menjernihkan kaca objek dan kemudian kaca objek siap ditutup menggunakan larutan *entelle* dan kaca penutup. Hasil preparat dianalisis menggunakan mikroskop mengenai luasan dedahan lemak yang terjadi pada jaringan.

10. Pemeriksaan

Preparat yang telah selesai kemudian dilihat pada mikroskop cahaya dimulai dari perbesaran rendah ke tinggi. Parameter yang dilihat adalah luas dedahan berupa bekas penebalan pada lumen, membran tunika intima, media, atau adventitia.



Gambar 3.2
Bagan alur pembuatan preparat histologi

3.6 Pengambilan Data

Pengambilan data dilakukan terhadap sampel. Setelah mencit dibunuh, kemudian dilakukan analisis profil kadar kolesterol dan pembuatan preparat histologis. Data untuk total kolesterol adalah hasil pengukuran alat strip *Accucheck*. Untuk data kadar trigliserida dan HDL adalah hasil nilai absorbansi yang sudah dikalkulasi dalam rumus sesuai petunjuk dalam reagen kit, kemudian ditabulasi dan dianalisis secara statistik. Data preparat histologi yang diambil adalah bagian aorta dari potongan transversal organ jantung. Parameter yang

diukur adalah ukuran dedahan lemak pada dinding tunika serta keberadaan plaque lemak berupa gumpalan menghitam di area aorta. Pengukuran luas dedahan menggunakan mikrometer dan aplikasi *ImageJ*.

3.7 Analisis Data

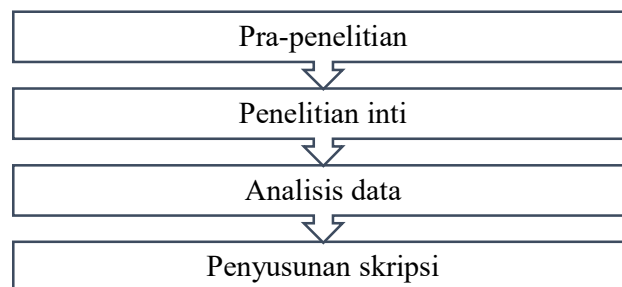
Data hasil pengamatan yang sudah ditabulasi diuji dahulu dengan uji normalitas sebagai syarat uji parametrik menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov untuk menilai sebaran data pada sebuah kelompok data atau variabel telah terdistribusi normal atautah tidak, kemudian uji homogenitas menggunakan uji Leven untuk mengetahui apakah beberapa varian populasi adalah sama atau tidak. Kemudian dilanjut dengan uji parametris *2 ways ANOVA with interaction* dan uji post hoc *Duncan* untuk mengetahui variabel mana yang berpengaruh signifikan. Bila uji normalitas terdapat perbedaan, maka dilakukan penghilangan *outlier* atau ditransformasi. Bila data tetap tidak normal maka diuji alternatif dengan uji non parametris friedman.

Pada analisis histologi jantung, hasil pengukuran dan kondisi histologis dianalisis secara kuantitatif dengan membandingkan luas dedahan tiap kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol kemudian dideskripsikan.

3.8 Alur Penelitian

3.8.1 Alur Penelitian

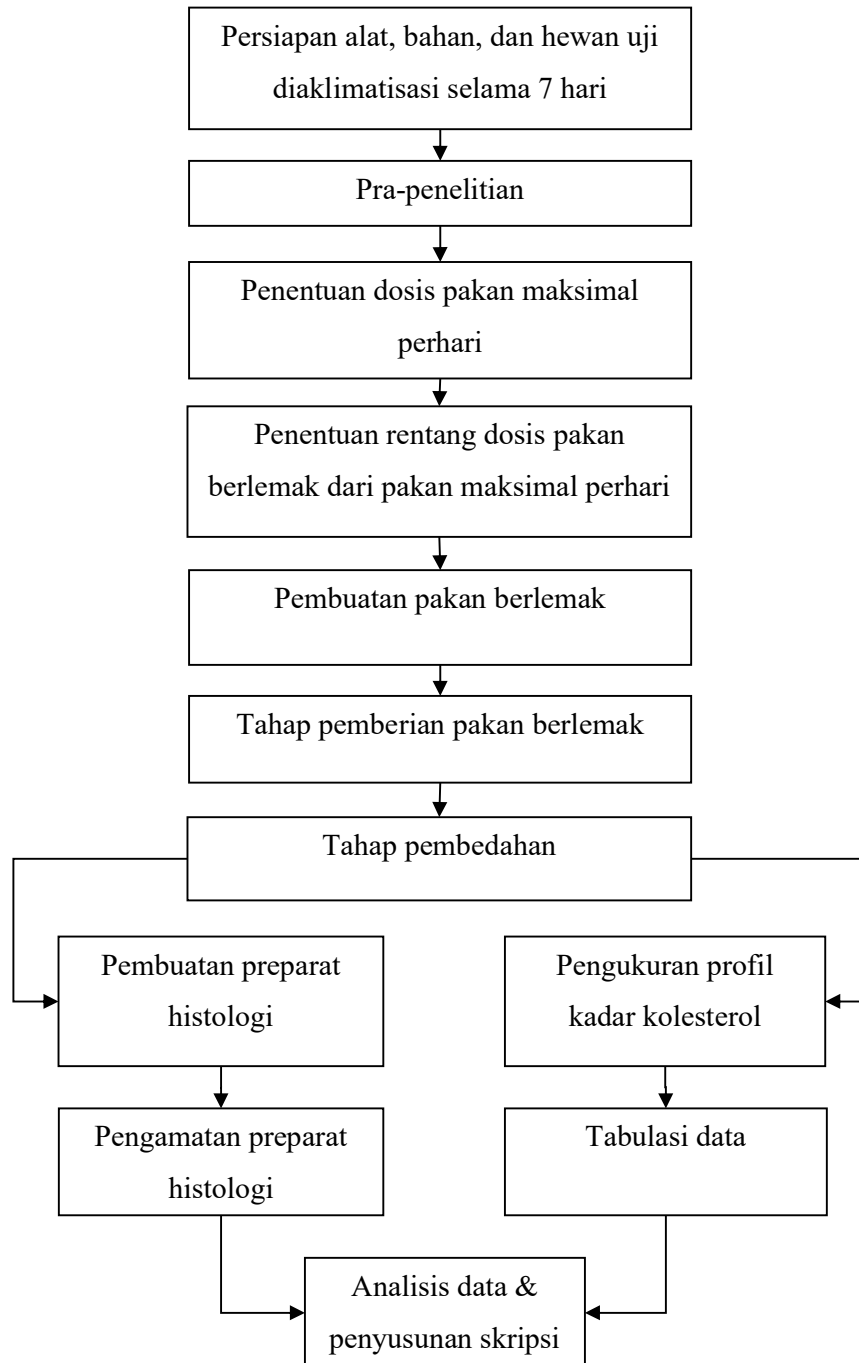
Alur penelitian dari penelitian “Profil Kadar Kolesterol dan Gambaran Histologis Aorta Jantung Pada *Mus musculus* Betina Var. Swiss Webster Setelah Pemberian Pakan Berlemak Pada Dosis dan Waktu Tertentu” disajikan pada Gambar 3.3 berikut ini.



Gambar 3.3
Bagan Alur Penelitian

3.8.2 Alur Kerja

Alur kerja dari penelitian “Dosis Dan Waktu Minimum Pemberian Lemak Dan Gambaran Histologi Jantung Untuk Pengkondisian Hiperkolesterolemia Hewan Aterosklerosis Pada Mus Musculus Var. Swiss Webster Betina” disajikan pada Gambar 3.4 berikut ini.



Gambar 3.4
Bagan Alur Kerja