

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan desain eksperimental murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* untuk mengetahui pengaruh pemberian PsP dari *Ganoderma lucidum* pada kadar profil lipid tikus (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar model diabetes mellitus tipe 2.

4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan. Banyak pengulangan ditentukan oleh rumus Federrerr yaitu (Solimun, 2001):

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

t : jumlah perlakuan, pada penelitian ini t=5

r : jumlah sampel penelitian

Sehingga jumlah pengulangan yang dilakukan adalah:

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$r \geq 4,75$$

$$r \approx 5$$

Jadi banyaknya pengulangan minimal 5 kali untuk setiap perlakuan. Jadi jumlah tikus yang digunakan pada penelitian ini sejumlah 5x5 kelompok =25 ekor hewan model.

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok dan Perlakuaannya

KELOMPOK	NAMA
1	Kontrol DM Negatif (K(-))
2	Kontrol DM Positif (K(+))
3	DM + PsP 50 mg/kgBB (DM50)
4	DM + PsP 150 mg/kgBB (DM150)
5	DM + PsP 300 mg/kgBB (DM300)

4.2.1 Kriteria Sampel

- a. Tikus berjenis kelamin jantan
- b. Umur 2-3 bulan
- c. Berat badan sekitar 150-200 gram
- d. Kondisi sehat dan tidak ada kelainan anatomik

4.3 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian PsP.
- b. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah Profil Lipid.

4.4 Lokasi dan waktu penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

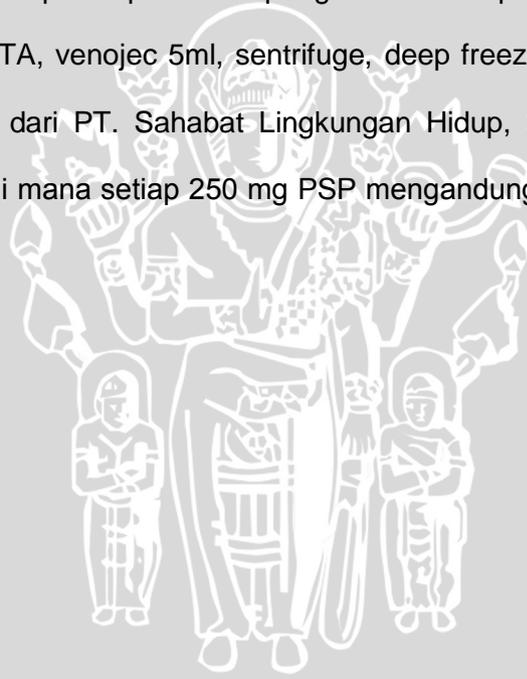
Pemeliharaan hewan coba dan pengukuran kadar Profil Lipid dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati - Biosains Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni sampai November 2013.

4.5 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk pemeliharaan hewan coba adalah kandang berukuran 40x30x20 cm beserta perlengkapannya seperti tempat makan dan minum tikus. Hewan coba dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus Wistar Race*) berumur 4 minggu dengan berat badan 150-200 gram dalam kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif. Tikus didapat dari CV Gamma Scientific Biolab Malang. Pakan yang digunakan adalah pakan normal yang biasa dipergunakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran. Alat dan bahan untuk analisis profil lipid dalam pengambilan sampel darah dan serum adalah spuit 3 ml, EDTA, venojec 5ml, sentrifuge, deep freezer, stiker, dan alat tulis. PsP didapatkan dari PT. Sahabat Lingkungan Hidup, Surabaya. Berupa sediaan *freeze dried* di mana setiap 250 mg PSP mengandung sekitar 80% β -D-glucan atau 200 mg.



4.6 Definisi operasional

Tabel 4.2 Definisi Operasional

Variabel	Definisi operasional	Alat ukur / Parameter	Hasil Ukur	Skala Ukur
Pemberian PsP	Kapsul yang mengandung ekstrak polisakarida dari <i>Ganoderma lucidum</i> 250mg yang mengandung β -D-glukan sebanyak 200mg diproduksi oleh mitra PT. SLH Surabaya	Dosis 50mg/kgBB, 150mg/kgBB, dan 300mg/kgBB	mg/kgBB	-
Profil lipid	Hasil pengukuran kadar HDL, LDL, trigliserida, dan kolesterol total di dalam serum	Menggunakan alat penganalisis Cobas Mira Plus	mg/dl	Rasio

1.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pengurusan Etik

Membuat dan mengurus etik penelitian di komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.7.2 Aklimatisasi Hewan Coba

Tikus dikondisikan pada lingkungan dan pakan yang sama selama 1 minggu. Pakan yang diberikan selama proses aklimatisasi ini adalah diet standard yang terdiri dari comfeed PARS, tepung terigu, dan air. Diet diberikan sebanyak 40 g/ ekor tikus/ hari dari campuran bahan tersebut dan diberikan setiap hari. Setelah 1 minggu, tikus-tikus tersebut akan diacak untuk masuk kedalam 5 kelompok perlakuan yang sudah ditetapkan, yaitu kelompok kontrol negatif yang diberi diet standar, kelompok kontrol positif yang diberi *high fat diet* dan diinduksi STZ, kelompok perlakuan yang diberi diet tinggi lemak, diinduksi STZ, dan diberi PsP50 mg, 150 mg, 300 mg per kg BB.

4.7.3 Pembuatan Pakan Standar dan *High Fat Diet*

Diet normal yang digunakan berupa pakan standart yang terdiri dari pakan ayam/ParS dengan kandungan air, protein, lemak, serat, abu, Ca, Phospor, antibiotika, dan coccidistat 66.6%, dan tepung terigu 33.4%.

Diet tinggi lemak berupa campuran pakan standart yang terdiri dari pakan ayam/ParS 57.3% dan tepung terigu 31.8% ditambah dengan kolesterol 1.9%, asam kolat 0.1%, dan minyak babi 8.9% (Ratnawati, 2012).

4.7.4 Pembuatan Tikus Model Diabetes Mellitus Tipe 2

Tikus diberi *high fat diet* selama 8 minggu. Setelah 4 minggu pertama, tikus diinduksi agar menjadi diabetes mellitus dengan injeksi STZ secara peritoneal. Dosis STZ yang diinjeksikan disesuaikan dengan berat badan tikus saat itu. Setelah itu, pemberian *high fat diet* dilanjutkan lagi sampai mencapai 8 minggu. Tikus diperiksa kadar glukosa darahnya selama penelitian ini, untuk memastikan tercapainya kadar glukosa darah yang tinggi yaitu >200 mg/dl. Kadar insulin plasma juga diperiksa pada penelitian ini. Kadar glukosa darah dan

insulin plasma ini perlu diukur untuk memastikan bahwa pada tubuh tikus sudah terjadi resistensi insulin sehingga bisa dikatakan bahwa tikus-tikus di dalam penelitian ini menderita diabetes mellitus tipe 2. Selain itu, juga dihitung sisa makan, sisa minum, serta urine yang dihasilkan oleh tikus setiap harinya untuk mengamati terjadinya perubahan akibat diabetes mellitus tipe 2 yaitu poliuria, polidipsi, dan polifagi.

4.7.5 Prosedur Pemberian PsP

PsP diberikan setelah tikus diberi high fat diet selama 8 minggu. Pemberian PsP ini dilakukan setiap hari selama 4 minggu. Prosedur pemberian PsP terhadap hewan coba adalah sebagai berikut.

1. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan:

- Dosis 1: $50 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 10 \text{ mg}$ (untuk tikus dengan BB 200 g) dalam 2 ml.
- Dosis 2: $150 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 30 \text{ mg}$ (untuk tikus dengan BB 200 g) dalam 2 ml.
- Dosis 3: $300 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 60 \text{ mg}$ (untuk tikus dengan BB 200 g) dalam 2 ml.

2. Larutan ekstrak polisakarida diberikan sebanyak 2 ml pada tiap tikus secara per oral.

3. Kebutuhan untuk treatment 1 kelompok tikus (6 ekor) selama 1 minggu:

• Dosis 1

Polisakarida: $10 \text{ mg} \times 6 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 420 \text{ mg}$.

Air : $2 \text{ ml} \times 6 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 84 \text{ ml}$.

Bila digunakan 100 ml air maka banyak ekstrak yang akan dilarutkan: $100 \text{ ml} / 84 \text{ ml} \times 420 \text{ mg} = 500 \text{ mg}$.

•Dosis 2

Polisakarida : 30 mg x 6 tikus x 7 hari = 1260 mg

Air : 2 ml x 6 tikus x 7 hari = 84 ml

Bila digunakan 100 ml air maka banyak ekstrak yang akan dilarutkan: 100 ml/84 ml x 1260 mg = 1500 mg.

•Dosis 3

Polisakarida : 60 mg x 6 tikus x 7 hari = 2520 mg

Air : 2 ml x 6 tikus x 7 hari = 84 ml

Bila digunakan 100 ml air maka banyak ekstrak yang akan dilarutkan: 100 ml/84 ml x 2520 mg = 3000 mg.

Cara melarutkan ekstrak polisakarida:

1. Ekstrak dalam tiap vial dilarutkan dalam 100 ml aquadest panas $\pm 70 - 80^{\circ}\text{C}$.
2. Diaduk dalam *beaker glass* menggunakan *magnetic stirer* selama ± 1 jam dengan suhu $\pm 70 - 80^{\circ}\text{C}$.
3. Larutan kemudian disaring menggunakan kertas saring.
4. Larutan dapat disimpan dalam *chiller* bersuhu $2-4^{\circ}\text{C}$ selama ± 1 minggu.

4.7.6 Pengukuran Profil Lipid**4.7.6.1 Persiapan serum**

Bahan dan Peralatan yang diperlukan untuk melakukan preparasi serum adalah sebagai berikut (Proimmune, 2009).

- Sampel darah tikus
- Tabung Vacutainer non EDTA
- Pipet serologis volume yang sesuai (steril)
- Tabung sentrifugasi
- Cryovials

- Mesin sentrifugasi

Prosedur untuk membuat preparasi serum adalah sebagai berikut.

1. Ambil darah lengkap ke dalam tabung Vacutainer yang tidak mengandung antikoagulan. Ambillah sekitar 2½ kali volume yang dibutuhkan untuk digunakan
2. Lalu diinkubasikan dalam posisi tegak pada suhu kamar selama 30-45 menit (tidak lebih dari 60 menit) untuk memungkinkan pembekuan
3. Sentrifuse selama 15 menit pada kecepatan yang direkomendasikan produsen (biasanya 1000-2000 RCF). Jangan menggunakan rem untuk menghentikan mesin sentrifugasi.
4. Secara cermat aspirasikan supernatan (serum) pada suhu kamar dan masukkan ke dalam tabung sentrifugasi, usahakan tidak mengganggu lapisan sel atau mentransfer sel. Gunakan pipet bersih untuk masing-masing tabung.
5. Periksa serum untuk kekeruhan. Sampel keruh harus disentrifugasi dan diaspirasi lagi untuk menghilangkan sisa materi yang tidak larut.
6. Alikuot ke cryovials dan simpan pada -80 ° C. Pastikan bahwa cryovials telah berlabel dengan informasi yang relevan dan memadai (Proimmune, 2009).

4.7.6.2 Prosedur Pengukuran Profil Lipid

Pemeriksaan kadar profil lipid dilakukan setelah semua kelompok diberi perlakuan selama 12 minggu. Pemeriksaan LDL-kolesterol dan HDL-kolesterol direk menggunakan metode homogenous dan dibutuhkan serum sampel masing-masing sebanyak 0,2 ml untuk diperiksa dengan reagen Daichi dan alat Cobas Mira. Pemeriksaan trigliserida menggunakan metode colorimetric enzymatic test Glycerol-3 Phosphate Oxydase (GPO) PAP, diperlukan 0,2 ml serum sampel dan diperiksa dengan reagen Randox dan alat Cobas Mira (Muliarta dkk, 2009).

4.8. Uji analisis data

Data hasil penelitian disajikan dalam $\text{mean} \pm \text{SD}$ dalam bentuk deskriptif. Kemudian semua data diuji homogenitasnya dengan Levene Test untuk mengetahui bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen ($p=0,05$). Setelah itu dilakukan uji normalitas dengan menggunakan metode Saphiro Wilk untuk mengetahui bahwa sebaran data penelitian ini normal. Setelah itu dilakukan analisis dengan statistik parametrik dengan SPSS versi 16, yaitu *One-way ANOVA* setelah memenuhi uji normalitas data dan uji homogenitas varian. Setelah dilakukan Anova akan dilakukan uji lanjutan yaitu berupa uji Post Hoc Tukey untuk melihat signifikansi masing-masing kelompok. Dan juga dilakukan uji korelasi Pearson untuk mengetahui kekuatan korelasi tiap kelompok.



4.9 Alur Penelitian

