

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental* di laboratorium secara *in vivo* dengan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* untuk mengetahui pengaruh pemberian PSP terhadap ketebalan PVAT. Penelitian ini dilakukan dengan cara menguji pengaruh pemberian PSP terhadap perubahan ketebalan PVAT pada tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberikan diet tinggi lemak selama 12 minggu.

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Pengulangan Sampel

Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan. Banyak pengulangan ditentukan oleh rumus Federrer (Setiawan, 2010) yaitu :

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

t : jumlah perlakuan, pada penelitian ini t=5

r : jumlah sampel penelitian

Sehingga jumlah pengulangan yang dilakukan adalah:

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$r = 4,75$$

Dengan pembulatan ke atas, didapatkan banyaknya pengulangan adalah minimal 5 kali untuk setiap perlakuan. Sehingga diperlukan sampel sebanyak 5 tikus untuk setiap kelompok atau 25 tikus secara keseluruhan.

4.2.2 Kriteria Sampel

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus berjenis kelamin jantan.
- b. Umur \pm 6-8 minggu.
- c. Berat badan sekitar 100-200 gram.
- d. Kondisi sehat dan tidak ada kelainan anatomik.

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus mengalami diare selama masa penelitian yang ditandai dengan feses tidak terbentuk dan atau mengalami penurunan berat badan.
- b. Tikus mati dan sakit selama masa perlakuan.
- c. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya dan pengukuran ketebalan PVAT dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli sampai Oktober 2013.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian PSP dengan 3 dosis berbeda, yaitu 50, 150, dan 300 mg/kgBB.

4.4.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ketebalan PVAT.

4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang didapatkan dari CV. Gamma Scientific Biolab, Malang.
2. Kapsul PSP yang digunakan dalam penelitian ini mengandung ekstrak PSP 250mg yang mengandung 200mg β -D-Glukan, dan didapatkan dari PT. SLH, Surabaya. PSP diisolasi dari miselium *Ganoderma lucidum*.
3. Diet normal berupa pakan standart yang terdiri dari pakan ayam/PARS (dengan kandungan air, protein, lemak, serat, abu, Ca, Phospor, antibiotika, coccidiostat) 66.6% dan tepung terigu 33.4% (Mawarti dan Ratnawati, 2012).
4. Diet tinggi lemak berupa pakan standart (pakan ayam/PARS 57.3% dan tepung terigu 31.8%) ditambah kolesterol 1.9%, asam kolat 0,1% dan minyak babi 8.9% (Mawarti dan Ratnawati, 2012).
5. PVAT adalah jaringan adiposa yang mengelilingi pembuluh darah yang letaknya berbatasan dengan tunika adventitia yang diketahui pada preparat aorta dengan menggunakan pulasan *Hematoksilin-Eosin* (HE). PVAT diukur

dengan menggunakan *software* dotslide yang hasilnya didapatkan dalam satuan μm dengan skala rasio.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Alat dan bahan yang digunakan adalah kandang, sekam dan air minum untuk tikus.

4.6.2 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Diet Normal

Alat dan bahan yang digunakan adalah timbangan analitik, baskom, PARS 66.6%, dan tepung terigu 33.4%.

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Diet Tinggi Lemak

Alat dan bahan yang digunakan adalah timbangan analitik, baskom, PARS 57.3% dan tepung terigu 31.8% ditambah kolesterol 1.9%, asam kolat 0,1% dan minyak babi 8.9%.

4.6.4 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Tikus

Alat dan bahan yang digunakan adalah gunting bedah, pinset, jarum pentul, kapas, eter, formalin 10%, alkohol, dan botol organ.

4.6.5 Alat dan Bahan untuk Pengukuran Ketebalan PVAT

Alat dan bahan yang digunakan adalah preparat aorta, mikroskop cahaya, dan komputer dengan *software* dotslide.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan coba

Tikus diaklimatisasi terlebih dahulu, yaitu dikondisikan dengan lingkungan dan pakan yang sama selama 2 minggu. Tikus diberikan diet normal

yang terdiri dari PARS 66,6%, tepung terigu 33,4%. Diet diberikan sebanyak 30 g/ekor/hari dari campuran bahan tersebut dan diberikan setiap satu kali sehari.

4.7.2 Pembagian Kelompok Perlakuan

Setelah aklimatisasi, tikus dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif yang diberi diet normal, kelompok kontrol positif yang diberi diet tinggi lemak, dan kelompok perlakuan yang diberi diet tinggi lemak dan diberi PSP 50 mg, 150 mg, 300 mg/kgBB. Dosis ini ditentukan berdasarkan penelitian terdahulu mengenai evaluasi aktifitas antioksidan dari polisakarida *Ganoderma lucidum*.

4.7.3 Pemberian Pakan dan Pembuatan Tikus Model Hiperkolesterolemia

Setiap tikus diberikan pakan sesuai dengan kelompoknya. Kelompok negatif diberikan diet normal yang sama seperti saat aklimatisasi, sedangkan kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan masing-masing diberikan diet tinggi lemak yang terdiri dari campuran PARS 57.3% dan tepung terigu 31.8% ditambah kolesterol 1.9%, asam kolat 0,1% dan minyak babi 8.9% sebanyak 40 mg selama 12 minggu.

4.7.4 Pemberian PSP

Pemberian PSP dilakukan secara per oral dengan metode sonde. Pemberian PSP ini dilakukan satu kali setiap hari selama 4 minggu setelah pemberian diet tinggi lemak selama 8 minggu. Ketiga kelompok perlakuan

diberikan PSP dengan dosis berturut-turut 50, 150, dan 300 mg/kgBB/hari. Penyondean dilakukan dengan PSP yang sudah dilarutkan sebelumnya dengan langkah sebagai berikut:

1. Larutan ekstrak PSP diberikan secara oral melalui penyondean pada tikus dengan dosis masing-masing 2 mL.
2. PSP per kelompok perlakuan diberikan dengan perhitungan sebagai berikut (berat setiap tikus kurang lebih 0,2 kg):
 1. Tikus dosis PSP 50 mg : $50 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 10 \text{ mg}$
 2. Tikus dosis PSP 150 mg : $150 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 30 \text{ mg}$
 3. Tikus dosis PSP 300 mg : $300 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 60 \text{ mg}$
3. Kebutuhan PSP selama satu minggu untuk setiap kelompok perlakuan:
 1. Tikus dosis PSP 50 mg/kgBB:
Polisakarida : $10 \text{ mg} \times 5 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 350 \text{ mg}$.
Air : $2 \text{ ml} \times 5 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 70 \text{ mL}$.
Keperluan untuk satu minggu dengan 100 mL air: $100 \text{ ml} \times 350 \text{ mg} / 70 \text{ ml} = 500 \text{ mg}$.
 2. Tikus dosis PSP 150 mg/kgBB
Polisakarida : $30 \text{ mg} \times 5 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 1050 \text{ mg}$.
Air : $2 \text{ ml} \times 5 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 70 \text{ ml}$.
Keperluan untuk satu minggu dengan 100 mL air: $100 \text{ ml} \times 1050 \text{ mg} / 70 \text{ ml} = 1500 \text{ mg}$.
 3. Tikus dosis PsP 300 mg/kgBB:
Polisakarida : $60 \text{ mg} \times 5 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 2100 \text{ mg}$.

Air : 2 ml x 5 tikus x 7 hari = 70 ml.

Keperluan untuk satu minggu dengan 100 mL air: $100 \text{ ml} \times 2100 \text{ mg} / 70 \text{ ml} = 3000 \text{ mg}$

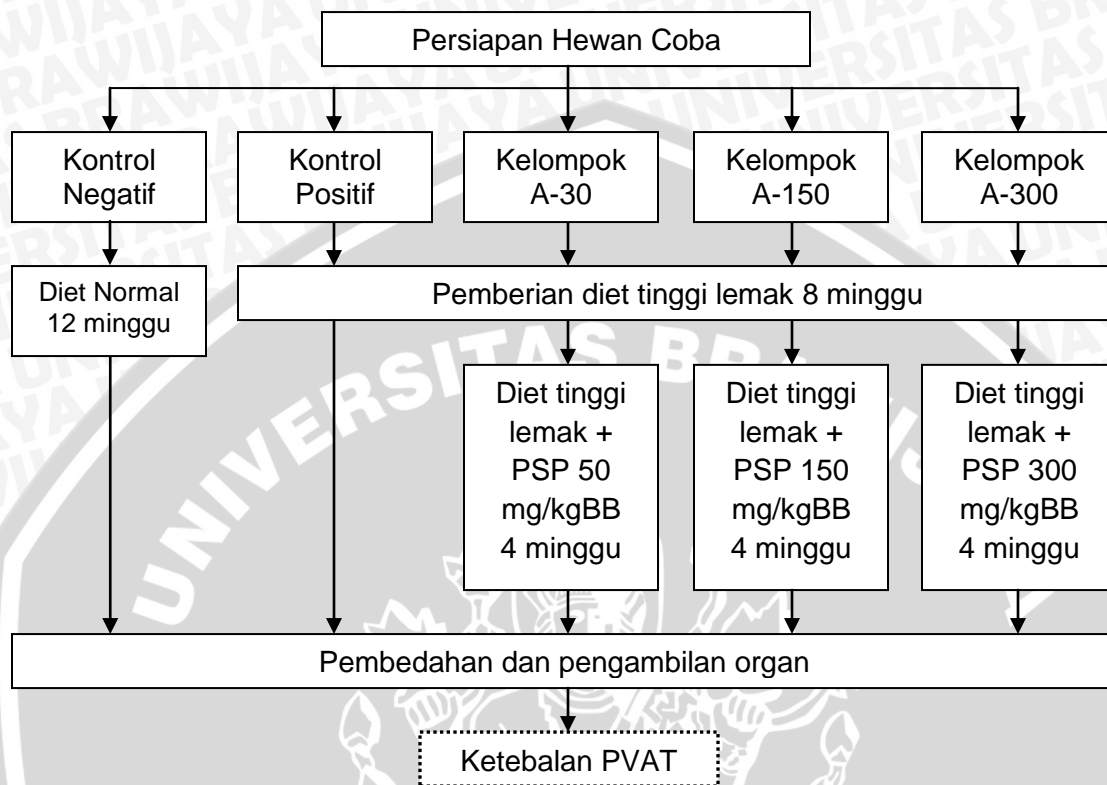
4. Ekstrak dilarutkan dalam 100 mL aquades panas bersuhu kurang lebih 70-80⁰ C. Ekstrak diaduk dengan pengaduk magnetik (magnetic stirrer) selama kurang lebih satu jam dengan suhu 70-80⁰ C. Larutan PSP yang telah selesai diaduk disaring menggunakan kertas saring dan disimpan dalam lemari pendingin bersuhu kurang lebih 2-4⁰ C.

4.7.5 Pembedahan Tikus

Setelah 12 minggu perlakuan, dilakukan pembedahan pada tikus yang sebelumnya sudah dianestesi dengan menggunakan eter. Setelah itu, tikus ditaruh di tempat pembedahan dan dilakukan fiksasi pada keempat kaki tikus dengan menggunakan jarum. Kemudian dilakukan pembedahan tikus untuk mengambil aorta yang kemudian ditaruh dalam botol organ dan diawetkan dengan menggunakan formalin 10%.

4.7.6 Pengukuran Ketebalan PVAT

Ketebalan PVAT diukur dengan melakukan pengamatan pada preparat aorta. Preparat aorta dibuat dengan metode blok parafin dan diberi pulasan hematoksilin-eosin. Preparat aorta discan terlebih dahulu dengan menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 400x. Setelah itu dilakukan pengukuran pada 3 area, yaitu yang terpanjang, terpendek, dan sedang, dengan menggunakan *software* dotslide, kemudian ketiga nilai tersebut dirata-rata.



Keterangan:

 : Variabel yang diukur

 : Variabel yang tidak diukur

Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.8 Pengolahan Data

Analisis data yang digunakan adalah statistik parametrik, yaitu *One-way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) setelah memenuhi uji normalitas data dan uji homogenitas varian. Apabila data signifikan ($p < 0,05$), akan dilakukan Uji Post Hoc untuk mengidentifikasi perbedaan antar kelompok. Analisis data menggunakan *software SPSS (Statistical Product of Service Solution)* for Windows versi 17.0.