

BAB IV

METODE PENELITIAN

Pada bab metode penelitian ini menjelaskan tentang detail penelitian meliputi jenis penelitian, sampel penelitian, variabel, lokasi dan waktu penelitian, alat dan bahan, definisi operasional, prosedur penelitian, dan alur penelitian.

4.1 Jenis Penelitian/Desain

Penelitian ini dirancang menggunakan desain eksperimental murni (*true experimental design*) secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* untuk mengetahui pengaruh paparan subkronik peptida polisakarida (PsP) dari Jamur *Ganoderma lucidum* terhadap kadar profil lipid pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus Wistar (*Rattus norvegicus*). Banyak tikus per kelompok ditentukan dengan rumus Federrer (Solimun, 2002):

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

Dengan perincian sebagai berikut:

t = jumlah perlakuan yang diterapkan pada penelitian (4)

r = jumlah dari sampel penelitian

Berdasarkan rumus tersebut di atas, jumlah pengulangan minimal untuk tiap kelompok perlakuan adalah:

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

$$3r - 3 \geq 15$$

$$r = \pm 6$$

Jumlah minimal tikus yang digunakan dalam tiap kelompok adalah 6 sesuai dengan rumus Federrer. Namun untuk mengantisipasi tikus mati selama perlakuan, maka jumlah tikus dijadikan 10 ekor tiap kelompok

Empat kelompok perlakuan yang ada adalah sebagai berikut (masing-masing 10 ekor tikus):

1. Kelompok kontrol negatif
2. Kelompok perlakuan dengan rincian sebagai berikut:
 1. Kelompok dengan pemberian PsP 300 mg/kgBB
 2. Kelompok dengan pemberian PsP 600 mg/kgBB
 3. Kelompok dengan pemberian PsP 1200 mg/kgBB

Sehingga total dari seluruh sampel yang digunakan adalah 40 ekor tikus *Rattus Norvegicus Wistar Race* dengan masing-masing tikus berusia 6-8 minggu dan memiliki berat 150-200 gram.

4.3 Variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dibedakan menjadi:

1. Variabel bebas: pemberian PsP setiap hari selama 90 hari
2. Variabel terikat : kadar kolesterol total, TG, LDL dan HDL

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian ini adalah Laboratorium Farmakologi FKUB. Waktu dimulainya penelitian adalah 13 April 2014, yang mana adalah waktu kedatangan tikus di laboratorium dan juga dimulainya masa aklimatisasi tikus. Penelitian

diakhiri pada 19 Juli 2014 yang merupakan periode analisis data hasil penelitian sesudah pengamatan hasil parameter penelitian.

4.5 Alat dan Bahan

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain:

1. Kandang untuk tikus subjek penelitian
2. Neraca elektronik untuk menimbang pakan tikus.
3. Sonde untuk pemberian peptide polisakarida (PsP) pada tikus.
4. Batang pengaduk untuk melarutkan PsP dengan akuades.
5. Peralatan pembedahan (papan bedah, jarum pentul, gunting).
6. Alat untuk preparasi sampel darah: spuit 10 cc, tabung serologi 3 ml, pipet endorf, pipet hematokrit, blue tip, mikrotube, sentrifuse 10-50 μ l, label data.
7. Alat untuk membawa sampel: *cool box*, *dry ice*.
8. Alat untuk mengukur kadar profil lipid: cobas-6000

Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

1. Tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*) berusia 6-8 minggu dengan berat 150-200 gram.
2. Pakan standard tikus (pakan ayam / ParS dengan kandungan air, protein, lemak, serat, abu, Ca, Phospor, antibiotika, coccidiostat 66.6% dan tepung terigu 33.4%) dan air minum.
3. Peptida polisakarida (PsP) dari jamur *Ganoderma lucidum* dengan komposisi ekstrak *Ganoderma lucidum* 250 mg yang setiap gramnya mengandung 200 mg (PsP) β -D-glucan.

4. Bahan anestesi untuk pembedahan.
5. Reagen profil lipid

4.6 Definisi operasional

Variabel	Definisi operasional	Alat ukur / Parameter	Hasil Ukur	Skala Ukur
Paparan PsP setiap hari selama 90 hari	Pemberian PsP yang mengandung ekstrak polisakarida dari <i>Ganoderma lucidum</i> 250mg yang mengandung β -D-glukan 200 mg secara oral dengan dosis 1 ml selama 90 hari	Dosis 300 mg/kgBB, 600 mg/kgBB, dan 1200 mg/kgBB	mg/kgBB	-
Profil lipid	Hasil pengukuran kadar kolesterol total, TG, LDL dan HDL di dalam serum	Menggunakan alat penganalisis Cobas-6000	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 dan dinyatakan layak etik dengan nomor: 400/112/K.3/302/2014.

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 pakan standard yang terdiri dari comfeed PARS, tepung terigu, dan air. Pakan diberikan sebanyak 35 g/ ekor tikus/ hari dari campuran bahan tersebut dan diberikan setiap hari. Setelah 1 minggu, tikus-tikus tersebut akan dikelompokkan berdasarkan berat badan ke dalam lima kelompok perlakuan yang sudah ditetapkan, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif yang diberi PsP dengan dosis 1200 mg/kgBB, 600 mg/kgBB dan 300 mg/kgBB.

4.7.3 Pembuatan Pakan

Pakan 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%.

4.7.4 Prosedur Pemberian PsP

Pemberian PsP dilakukan setiap hari selama 90 hari. Penyondean dilakukan pada tikus dengan PsP yang sudah dilarutkan sebelumnya dengan persyaratan sebagai berikut:

1. Larutan ekstrak PsP diberikan secara oral melalui penyondean pada tikus dengan dosis masing-masing 1 ml.
2. PsP per kelompok perlakuan diberikan dengan perhitungan sebagai berikut

(berat setiap tikus kurang lebih 200 gram/0,2 kg):

1. Pada tikus dosis PsP 300 mg : $300 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 60 \text{ mg}$
2. Pada tikus dosis PsP 600 mg : $600 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 120 \text{ mg}$
3. Pada tikus dosis PsP 1200 mg : $1200 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 240 \text{ mg}$

3. Kebutuhan PsP selama satu minggu untuk setiap kelompok perlakuan:

1. Tikus dosis PsP 300 mg/kgBB:

Polisakarida : $60 \text{ mg} \times 10 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 4200 \text{ mg}$.

Air : $1 \text{ ml} \times 10 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 70 \text{ mL}$.

Keperluan untuk satu minggu dengan 100 mL air:

$$100 \text{ ml} / 70 \text{ ml} \times 4200 \text{ mg} = 6.000 \text{ mg}.$$

2. Tikus dosis PsP 600 mg/kgBB:

Polisakarida : $120 \text{ mg} \times 10 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 8400 \text{ mg}$.

Air : $1 \text{ ml} \times 10 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 70 \text{ ml}$.

Keperluan untuk satu minggu dengan 100 mL air:

$$100 \text{ ml}/70 \text{ ml} \times 8400 \text{ mg} = 12000 \text{ mg}$$

3. Tikus dosis PsP 1200 mg/kgBB:

Polisakarida : 240 mg x 10 tikus x 7 hari = 16800 mg.

Air : 1 ml x 10 tikus x 7 hari = 70 ml.

Keperluan untuk satu minggu dengan 100 mL air:

$$100 \text{ ml}/70 \text{ ml} \times 16800 \text{ mg} = 24000 \text{ mg}$$

4. Ekstrak dilarutkan dalam 100 mL aquades.
5. Ekstrak diaduk dengan batang pengaduk selama 5 menit.
6. Larutan PsP yang telah selesai diaduk siap untuk disonde ke tikus kelompok perlakuan.

4.7.5 Pengukuran Lipid

Prosedur untuk membuat preparasi serum adalah sebagai berikut.

1. Mengambil darah lengkap sekitar $2\frac{1}{2}$ kali volume yang dibutuhkan ke dalam tabung Vacutainer yang tidak mengandung antikoagulan.
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).
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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pastikan bahwa cryovials telah berlabel dengan informasi yang relevan dan memadai (Proimmune, 2009).

4.7.5.1 Prosedur Pengukuran Lipid

Serum untuk analisis profil lipid disimpan pada $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai sampel dianalisis. Konsentrasi kolesterol total, TG, LDL dan HDL dinilai dengan prosedur enzimatik colormetrik pada Cobas-6000 ditambah *analyzer* (Roche Diagnostic, Basel, Swiss).

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 Kolmogorov Smirnov untuk mengetahui bahwa sebaran data penelitian ini normal. Setelah itu dilakukan analisis dengan statistik parametrik dengan SPSS versi 17, yaitu *One-way ANOVA* setelah memenuhi uji normalitas data dan uji homogenitas varian. Apabila ditemukan perbedaan yang signifikan pada minimal dua kelompok perlakuan, akan dilakukan uji PostHoc untuk mengidentifikasi kelompok yang berbeda tersebut.

4.9 Alur Penelitian

Pengurusan *ethical clearance* (proposals, formulir layak etik, dan penjelasan etik penelitian)

Pembelian tikus Wistar Wistar (*Rattus norvegicus*) 80 ekor (40 jantan, 40 betina)

Masa aklimatisasi tikus (7 hari)

Selama 90 hari

1	2	3	4
Kelompok normal	PsP 1200 mg/kgBB	PsP 600 mg/kgBB	PsP 300 mg/kgBB

Tikus dieuthanasia dengan eter

Pemeriksaan kadar profil lipid
(kolesterol total, TG, LDL dan HDL)

Analisis data

