

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 efek pemberian Darapladib terhadap ketebalan PVAT. Penelitian ini dilakukan dengan cara menguji efek pemberian Darapladib terhadap perubahan ketebalan PVAT pada tikus *Sprague - Dawley* yang diberikan diet tinggi lemak selama 8 minggu dan 16 minggu.

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Pengulangan Sampel

Sampel yang digunakan yaitu tikus *Sprague - Dawley*. Banyak pengulangan ditentukan oleh rumus *Federrer* yaitu (Ukhrowi, 2011):

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

t : jumlah perlakuan, pada penelitian ini t=6

r : jumlah sampel penelitian

Sehingga jumlah pengulangan yang dilakukan adalah:

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$r = 4$$

Dari rumus diatas didapatkan hasil minimal pengulangan 4x untuk setiap perlakuan. Kemudian ditambahkan 1 ekor tikus untuk berjaga-jaga bila ada tikus yang mati. Sehingga diperlukan sampel sebanyak 5 tikus untuk setiap kelompok atau 30 tikus secara keseluruhan. Berikut merupakan rincian dari 5 kelompok perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini (masing – masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus):

1. Kelompok Kontrol negative
2. Kelompok kontrol positif dengan pemberian HFD (High Fat Diet) selama 8 minggu
3. Kelompok kontrol positif dengan pemberian HFD (High Fat Diet) selama 16 minggu
4. Kelompok kontrol positif dengan pemberian HFD (High Fat Diet) dan Darapladib selama 8 minggu
5. Kelompok kontrol positif dengan pemberian HFD (High Fat Diet) dan Darapladib selama 16 minggu

4.2.2 Kriteria Sampel

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

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

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

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

Waktu penelitian dimulai 25 agustus 2014 yang mana adalah waktu kedatangan tikus di laboratorium dan juga dimulainya masa aklimatisasi tikus. Penelitian diakhiri pada maret 2015 yang merupakan metode analisis data hasil penelitian sesudah pengamatan hasil parameter penelitian.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian Darapladib

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ketebalan PVAT.

4.5 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur (Parameter)	Hasil Ukur	Skala Ukur
----------	----------------------	-----------------------	------------	------------

Darapladib	Darapladib yang digunakan merupakan produksi dari Glaxo Smith Kline (GSK) dengan dosis yang diberikan adalah 20 mg per 200 kg/BB tikus setiap hari selama 8 minggu dan 16 minggu tergantung dari jenis perlakuan.	Darapladib diberikan dengan metode sonde.	Mg/KgBB	Rasio
PVAT	PVAT adalah jaringan adiposa yang mengelilingi pembuluh darah yang letaknya berbatasan dengan tunika adventitia yang diketahui pada preparat aorta dengan menggunakan pengecatan <i>Hematoksilin-Eosin</i> (HE). PVAT diukur dengan menggunakan <i>software</i> dotslide.	Preparat aorta discan menggunakan mikroskop pada pembesaran 400x, kemudian dilihat dan diukur dengan menggunakan <i>software</i> dotslide pada computer.	µm	Rasio
Model Dislipidemia	Pembuatan model dislipidemia pada tikus dengan cara memberikan pakan	Diukur kadar kolesterol total, HDL, dan LDL tikus setelah	gram	Rasio

	<p>High Fat Diet (HFD) dengan komposisi: pakan ayam/PARS 62%, tepung terigu 20% kolesterol 1%, asam kolat 0,2% dan kurvet 16,8%. Pakan diberikan sehari 1 kali sebesar 26 gram.</p>	<p>dilakukan pembedahan pada setiap kelompok tikus dengan menggunakan timbangan</p>		
--	---	---	--	--

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Alat dan bahan yang digunakan untuk pemeliharaan hewan coba:

1. Kandang tikus untuk subjek penelitian
2. Neraca elektronik untuk menimbang sisa pakan
3. Sekam

4.6.2 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Diet Normal

Alat dan bahan yang digunakan adalah:

1. Neraca elektronik
2. Pakan standar tikus

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Diet Tinggi Lemak

Alat dan bahan yang digunakan adalah:

1. Neraca elektronik
2. Baskom
3. PARS 62%
4. Tepung terigu 20%
5. Kolesterol 1%

6. Asam kolat 0,2%

7. Kurvet 16,8%

4.6.4 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Tikus

Alat dan bahan yang digunakan adalah:

1. S spuit untuk anastesi
2. Ketamine (anastesi)
3. Papan bedah
4. Jarum pentul untuk memfiksasi tikus dipapan bedah
5. Gunting untuk membedah tikus
6. Pinset untuk membantu pembedahan
7. Kapas
8. Botol organ
9. Spidol untuk menandai dibotol organ
10. Wadah untuk mencuci organ tikus
11. Larutan PBS untuk mencuci organ tikus
12. Formalin 10%

4.6.5 Alat dan Bahan untuk Pengukuran Ketebalan PVAT

Alat dan bahan yang digunakan adalah:

1. Preparat aorta
2. Mikroskop
3. Komputer dengan *software* dotslide.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pengurusan Administrasi

Penelitian ini diawali dengan pengurusan etik (*ethical clearance*) yang meliputi proposal, formulir layak etik, dan penjelasan etik penelitian. Setelah itu dilanjutkan dengan pengurusan administrasi penelitian seperti pendaftaran penggunaan laboratorium untuk pemeliharaan tikus dan pembelian alat dan bahan penelitian.

4.7.2 Persiapan Hewan Coba

Proses aklimatisasi pada tikus subjek penelitian dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Biosains Universitas Brawijaya selama 1 minggu untuk seluruh tikus dengan pakan standard agar tikus mengalami adaptasi dengan lingkungannya. Pakan diberikan sekali dalam 24 jam yang kemudian diganti pada hari berikutnya. Pakan memiliki berat masing-masing 30 gram. Setelah dilakukan masa aklimatisasi terhadap tikus, dilanjutkan dengan proses pengacakan (*randomisasi*) terhadap tikus untuk dikelompokkan ke dalam masing-masing kelompok perlakuan.

4.7.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Setelah aklimatisasi, tikus dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif yang diberi diet normal, kelompok kontrol positif yang diberikan HFD selama 8 minggu, kelompok kontrol positif yang diberikan HFD selama 16 minggu, kelompok perlakuan yang diberi HFD dan darapladib selama 8 minggu, dan kelompok perlakuan yang diberi HFD dan darapladib selama 16 minggu.

4.7.4 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 HFD yang terdiri dari campuran PARS 62% dan tepung terigu 20% ditambah kolesterol 1%, asam kolat 0,2% dan kurvet 16,8% dengan berat masing – masing pakan 26 gram.

4.7.5 Pemberian Darapladib

Pemberian darapladib dilakukan secara per oral dengan metode sonde. Pemberian darapladib ini dimulai ketika awal pemberian HFD pada tikus. Darapladib diberikan satu kali setiap hari selama 8 minggu dan 16 minggu sesuai kelompok tikus. Jumlah kebutuhan darapladib adalah sebagai berikut :

1. Kelompok Darapladib + HFD 8 minggu : 20mg x 0,2 kg x 5 ekor tikus x 56 hari = 1,120 mg
2. Kelompok Darapladib + HFD 8 minggu : 20mg x 0,2 kg x 5 ekor tikus x 56 hari = 1,120 mg

Total kebutuhan Darapladib adalah 3,360 mg

4.7.6 Pembedahan Tikus

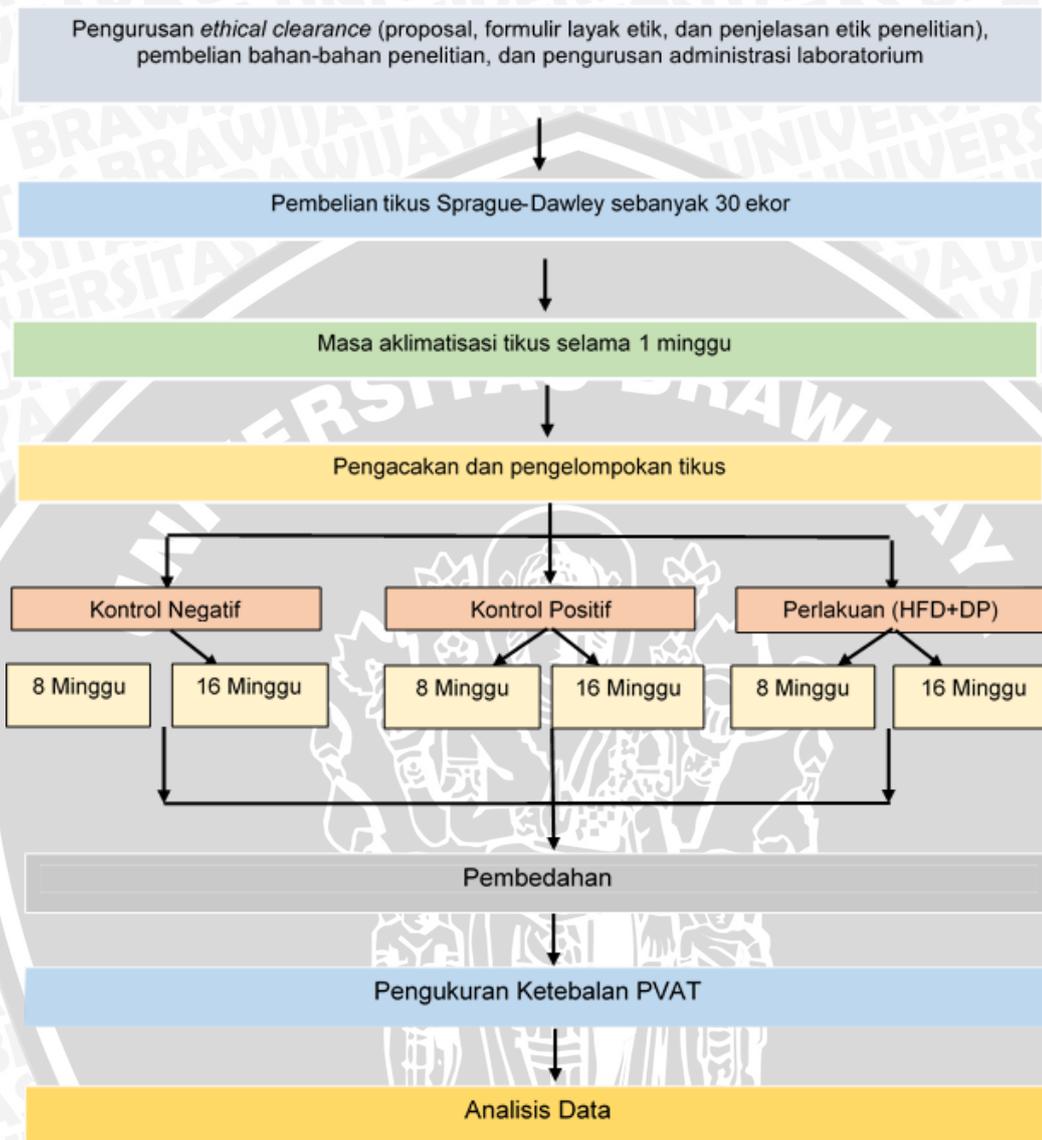
Setelah 8 minggu dan 16 minggu perlakuan, dilakukan pembedahan pada tikus yang sebelumnya sudah dianestesi dengan menggunakan ketamin. Setelah itu, tikus ditaruh di tempat pembedahan dan dilakukan fiksasi pada keempat kaki tikus dengan menggunakan jarum. Kemudian dilakukan pembedahan tikus untuk mengambil aorta yang kemudian ditaruh dalam botol organ dan diawetkan dengan menggunakan formalin 10%.

4.7.7 Pembuatan Preparat Aorta

Sampel yang diambil adalah potongan arcus aorta tikus. Aorta yang telah diambil dari tikus kemudian dipotong dengan ketebalan \pm 2-3 mm dan kemudian dimasukkan ke dalam formalin 10% untuk difiksasi selama 1 hari. Jaringan yang telah difiksasi kemudian diproses dengan menggunakan alat tissue tex prosesor, kemudian di blok dengan paraffin untuk selanjutnya dipotong dengan mesin microtome dengan ketebalan 3-5 mikron. Kemudian ditaruh dalam oven selama 1-2 jam dengan suhu 60 °C, lalu dimasukkan ke dalam larutan xylol selama 15 menit, alkohol 96% selama 3 menit, dan kemudian dicuci bersih dengan air mengalir selama 10 menit. Jaringan kemudian siap untuk diberi cat utama yaitu *Hematoksilin Eosin* selama 10-15 menit, lalu dicuci kembali dengan air mengalir selama 15 menit. Masukkan ke dalam alkohol asam 1% sebanyak 2-5 celup, lalu ke dalam amoniak air 3-5 celup. Setelah itu diberi cat pembanding yaitu eosin 1% selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi dengan memasukkan ke dalam alkohol 80% selama 3 menit, alkohol 96% selama 3 menit, dan alkohol 96% selama 3 menit, kemudian dilakukan penjernihan dengan larutan xylol selama 15 menit sebanyak 2 kali, lalu mounting dengan entelan dan deck glass. Preparat siap digunakan.

4.7.8 Pengukuran Ketebalan PVAT

Ketebalan PVAT diukur dengan melakukan pengamatan pada preparat aorta. Preparat aorta dibuat dengan metode blok parafin dan diberi pewarnaan hematoksilin-eosin. Preparat aorta discan terlebih dahulu pada beberapa daerah dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran 400x, kemudian dilihat dan diukur dengan menggunakan *software dotslide* pada computer. Pengukuran ketebalan PVAT dengan cara mengukur ketebalan terkecil, sedang dan terbesar dari setiap bagian PVAT pada aorta tikus kemudian dirata – rata.



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.8 Pengolahan Data

Data hasil penelitian disajikan dalam $\text{mean} \pm \text{SD}$. Kemudian semua data dianalisis dengan statistik parametrik dengan *Software Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 16 dengan tingkat signifikansi 0.05 ($p = 0.05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif sebagai berikut :

1. Uji Normalitas (menggunakan uji Shapiro-Wilk) : untuk menginterpretasikan suatu data apakah data tersebut memiliki persebaran data yang normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji

hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik. Uji normalitas yang digunakan pada penelitian ini adalah uji Shapiro-Wilk karena jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini kurang dari 50 ($n \leq 50$). Uji Shapiro-Wilk dianggap lebih akurat ketika jumlah subjek yang kita miliki kurang dari 50. Data dikatakan memiliki persebaran normal jika $p > 0.05$.

2. Uji Homogenitas (menggunakan uji Levene) : untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA. Pada penelitian ini menggunakan uji Levene. Suatu data dikatakan memiliki varian yang homogen apabila nilai signifikansinya $p > 0.05$.
3. Uji *Repeated* ANOVA (Uji *Repeated* ANOVA dan Uji Post Hoc (menggunakan uji Levene dan Duncan) : *Repeated Measures* ANOVA digunakan untuk melakukan uji beda > 2 kali pengukuran. Antar sampel harus berhubungan. Perbedaan pada dua kelompok dianggap bermakna apabila $p < 0.05$. Uji Post Hoc : untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes

ANOVA. Uji Post Hoc yang digunakan adalah uji Levene dan Duncan dengan tingkat signifikansi 95% ($p < 0.05$).



