

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian/Desain

Jenis penelitian ini adalah *true experimental* dengan desain penelitian *Randomized Only Post Test Controlled Group Design* secara *in vivo* pada tikus Sprague-Dawley sebagai subjek penelitian.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus Sprague-Dawley. Jumlah sampel yang digunakan ditentukan dengan rumus Federrer, yaitu (Dewi, et al., 2013):

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

Dimana :

t = jumlah perlakuan yang diterapkan pada penelitian (6)

r = jumlah ulangan dari sampel penelitian

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

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$r \geq 4$$

Sesuai rumus Federrer diatas maka jumlah minimal tikus yang digunakan dalam tiap kelompok adalah 4 ekor, sehingga pada penelitian ini menggunakan 5 tikus untuk tiap kelompok. Penelitian menggunakan 6 kelompok yang dibagi berdasarkan perlakuan dan waktu. Pembagian secara waktu, yaitu 8 dan 16 minggu bertujuan untuk menggambarkan adanya progresivitas aterosklerosis yang berbanding lurus dengan berjalannya waktu (Kumar, et al., 2007). Rincian pembagian kelompok adalah sebagai berikut :

1. Kelompok kontrol negatif yang diberikan pakan standar selama 8 minggu
2. Kelompok kontrol negatif yang diberikan pakan standar selama 16 minggu
3. Kelompok kontrol positif dengan pemberian HFD 8 minggu
4. Kelompok kontrol positif dengan pemberian HFD 16 minggu
5. Kelompok perlakuan dengan pemberian HFD serta Darapladib selama 8 minggu
6. Kelompok perlakuan dengan pemberian HFD serta Darapladib selama 16 minggu

Total dari seluruh sampel yang digunakan adalah 30 ekor Sprague-Dawley dengan usia masing-masing tikus berkisar dari 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 Darapladib
2. Variabel terikat: kadar *oxidized* LDL (Ox-LDL) plasma

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian ini adalah Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Biosains Universitas Brawijaya (UB). Waktu dimulainya penelitian adalah 25 Agustus 2014, yang mana adalah waktu kedatangan tikus di laboratorium dan juga dimulainya masa aklimatisasi tikus. Penelitian diakhiri pada Maret 2015 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 (kandang standard)
2. Neraca elektronik untuk menimbang sisa pakan tikus.
3. Spuit 5 cc untuk pengambilan sampel darah tikus.
4. Sonde untuk pemberian Darapladib pada tikus.
5. Peralatan pembedahan (papan bedah, jarum pentul, gunting).
6. 1 Tabung EDTA dan 1 tabung *plain* untuk menyimpan tiap sampel darah
7. Peralatan ELISA untuk mengukur kadar Ox-LDL plasma :
 - *Spectrophotometric* 1 Buah
 - Selaput Penutup Plat 5 Buah
 - Microelisa *stripplate* 12 well × 8 strip

Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

1. Tikus Sprague-Dawley berusia 6-8 minggu dengan berat 150-200 gram.
2. Pakan standard tikus
3. Pakan HFD (*High Fat Diet*) (ParS 62% dan tepung terigu 20%) ditambah kolesterol 1%, asam kolat 0,2% dan kurvet 16,8 %).
4. Darapladib
5. Bahan anestesi untuk pembedahan.
6. Bahan-bahan Spesimen serum darah 25 Buah
7. Bahan-bahan untuk mengukur kadar Ox-LDL plasma menggunakan

ELISA:

- *Reference standard* 2 vial
- *Reference standard & sample diluent* 1 vial (20 mL)

- *Concentrated Biotinylated Detection Ab* 1vial (120 μ L)
- *Biotinylated Detection Ab Diluent* 1vial (10mL)
- *Concentrated HRP Conjugate* 1vial (120 μ L)
- *Stop Solution* 1vial (10mL)
- *HRP Conjugate Diluent* 1vial (10mL)
- *Concentrated Wash Buffer (25 $\times$)* 1vial (30mL)
- *Substrate Reagent* 1vial 10mL

4.6 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Hasil Ukur	Skala
Pemberian Darapladib	Pemberian Darapladib dengan dosis sebesar 20 mg/KgBB tiap harinya kepada tikus Sprague-Dawley dengan metode sonde.	Dosis 20 mg/KgBB tiap hari setelah masa aklimatisasi selama 8 minggu atau 16 minggu tiap kelompok perlakuan.	mg/KgBB	Rasio
Ox-LDL plasma	Perhitungan kadar Ox-LDL plasma pada darah tikus Sprague-Dawley melalui penghitungan antibodi Ox-LDL plasma pada darah tikus Sprague-	ELISA Kit	ng/mL	Rasio

	Dawley oleh metode ELISA			
HFD	HFD diberikan setiap hari dengan komposisi : ParS 620 gram, tepung 200 gram, kurvet 168 gram, asam kolat 2 gram, dan kolesterol 10 gram. Pakan diberikan seberat 26 gram	Timbangan	Gram	Rasio

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. Aklimatisasi dan Pengelompokan Hewan Coba:

Proses aklimatisasi tikus subjek penelitian dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Biosains Universitas Brawijaya selama 1 minggu. Selama masa aklimatisasi, seluruh tikus diberi 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. Perlakuan:

Jenis perlakuan dibagi berdasarkan pengelompokan tikus yang telah dilakukan sebelumnya. Ada 6 kelompok perlakuan, yaitu kontrol positif yang diberikan HFD selama 8 minggu, kontrol positif yang diberikan HFD selama 16 minggu, kelompok yang diberi HFD dan Darapladib selama 8 minggu, dan kelompok yang diberi HFD dan Darapladib selama 16 minggu. Selain itu terdapat kelompok kontrol negatif yang diberi pakan standar. HFD merupakan pakan dengan komposisi Pars 62%,tepung terigu 20%,kolesterol 1%, asam kolat 0,2% dan kurvet 16,8 %. Darapladib diberikan bersamaan dengan pemberian HFD hari pertama. Berikut merupakan rincian kebutuhan Darapladib yang digunakan dalam penelitian ini:

1. Kelompok Darapladib + HFD 8 minggu : $20 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg} \times 5 \text{ ekor} \times 56 \text{ hari}$
= 1.120 mg
2. Kelompok Darapladib + HFD 16 minggu : $20 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg} \times 5 \text{ ekor} \times 112 \text{ hari}$
= 2.240 mg

Total kebutuhan Darapladib adalah 3.360 mg.

4.7.4. Pembedahan Tikus:

Tahap pembedahan tikus dimulai dengan pembiusan tikus melalui penyuntikan Ketamin. Perlu diketahui bahwa status penelitian ini adalah penelitian payung, sehingga walaupun dalam subbab ini hanya tertera prosedur pembedahan hanya bertujuan untuk pengambilan sampel darah, sebenarnya banyak organ lain yang juga diambil, seperti paru-paru, otak, jantung, aorta, ginjal,

lien, jaringan lemak, pankreas sehingga prosedur pembedahan ini mengikuti prinsip etik penelitian, yaitu mengambil sampel dan organ semaksimal mungkin dalam tiap prosedur pembedahan. Sampel darah sebanyak 5 cc diambil dari aorta dengan menggunakan spuit 5 cc dengan 2 kali pengambilan. Kemudian masukkan sampel darah ke botol penyimpanan EDTA dan plain masing-masing sebanyak 5 cc. Jika pengukuran sampel tidak dimungkinkan dilakukan dengan segera, simpan sampel dalam suhu -20°C Hindari siklus *freeze-thaw* berulang-ulang. Setelah itu, bersihkan area kerja sisa pembedahan dengan sabun dan jika perlu disemprot dengan alkohol.

4.7.5. Pengukuran Kadar Ox-LDL plasma dengan menggunakan metode

ELISA

Pengukuran dilakukan pada semua hewan coba baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan. Level antibodi Ox-LDL plasma diukur dari sampel darah aorta tikus dengan menggunakan *Rat Ox-LDL plasma (Oxidized Low Density Lipoprotein) ELISA kit* (Cat. No. E-EL-R0710). Berikut merupakan urutan pengukuran kadar Ox-LDL plasma pada sampel darah aorta tikus dengan menggunakan ELISA:

4.7.5.1 Persiapan Spesimen

Lakukan pengukuran sesegera mungkin setelah ekstraksi spesimen. Jika tidak bisa, spesimen dapat disimpan dalam -20 derajat Celcius, Hindari siklus *freeze-thaw* berulang-ulang. Tidak dapat mendeteksi sampel yang mengandung NaN_3 , karena NaN_3 menghambat aktivasi HRP.

4.7.5.2 Prosedur Pengujian Kadar Ox-LDL plasma dengan Uji ELISA

4.7.5.2.1 Prosedur Persiapan Reagen

1. Wash Buffer

Larutkan 30 mL Concentrated Wash Buffer dengan air bersih hingga mencapai 750 mL.

2. Standar

1. Sentrifusikan standar pada $10.000 \times g$ selama 1 menit

2. *Reconstitute* standar dengan 1.0mL of *Reference Standard & Sample Diluent*

3. Tutup rapat, bolak-balikkan beberapa kali. Setelah tercampur seluruhnya, aduk dengan pipet. Telah terbentuk larutan sebanyak 30ng/mL

4. Encerkan secara serial dengan menggunakan 0.5mL *Reference Standard & Sample Diluent* untuk mencapai konsentrasi 30, 15, 7.5, 3.75, 1.875, 0.938, 0.469, 0 ng/mL

3. *Biotinylated Detection Ab*

Persiapkan sejumlah 100 $\mu\text{L}/\text{well}$. Sentrifusikan, lalu campur dengan *Biotinylated Detection Ab Diluent* (1:100).

4. *Concentrated HRP Conjugated*

Persiapkan sejumlah 100 $\mu\text{L}/\text{well}$. Sentrifusikan, lalu campur dengan *Concentrated HRP Conjugate Diluent* (1:100).

5. *Substrate Antigen*

Jangan dibuka sebelum dipakai oleh karena sensitif terhadap paparan Cahaya.

4.7.5.2.2 Washing Procedure

Tambahkan 350 μ L *Wash Buffer* pada tiap *well*, rendam selama 1~2 menit.

Setelahh pembilasan terakhir, hilangkan sisa *wash buffer* dengan balik *plate* dan bersihkan dengan *absorbent paper* pada permukaan yang keras.

4.7.5.3. Pembacaan

1. Tambahkan 100 μ L standar/sampel pada tiap *well*. Inkubasi 90 menit di suhu 37°C
2. Hilangkan gumpalan. Tambahkan 100 μ L *Biotinylated Detection Ab*. Inkubasi 1 jam di suhu 37°C
3. Aspirasi dan bilas 3 kali.
4. Tambahkan 100 μ L HRP *Conjugate*. Inkubasi 30 menit di suhu 37°C
5. Aspirasi dan bilas 3 kali.
6. Tambahkan 90 μ L HRP *Substrate reagent*. Inkubasi 15 menit di suhu 37°C
7. Tambahkan 50 μ L *Stop solution*. Segera baca di spektrofotometri dengan panjang gelombang 450 nm.
8. Kalkulasikan hasil.

4.7.6 Pengukuran *intake* pakan tikus

Pengukuran *intake* (asupan) pada tikus digunakan untuk memastikan bahwa *intake* yang diberikan pada tiap tikus sama (homogenisasi) dan untuk melihat perbedaan efek pemberian pakan pada tiap-tiap kelompok. Hasil *intake* pakan didapatkan dari hasil pengurangan antara jumlah makanan yang diberikan dengan sisa pakan. Pengukuran *intake* dilakukan dengan eraca elektronik.

4.7.7 Pengukuran Berat Badan Tikus

Penghitungan peningkatan BB dilakukan dengan mengurangi BB tikus sebelum dilakukan pembedahan dengan BB awal tikus ketika pertama kali diberikan HFD dengan menggunakan neraca elektronik.

4.7.8 Pengukuran Kadar Profil Lipid Tikus

Profil lipid yang diukur dalam penelitian ini antara lain adalah kadar kolesterol total, HDL, dan LDL/VLDL dari sampel darah tikus dengan menggunakan EnzyChrom™ Kit yang diproduksi oleh BioAssay Systems.

4.7.9. Analisis Data:

Analisis data diawali dengan analisis deskriptif yang bertujuan menguji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene*. Setelah diketahui homogenitas data penelitian ($p \geq 0,5$), maka dilanjutkan dengan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* untuk melihat data penelitian normal atau tidak (bisa dikatakan normal apabila $p \geq 0,5$). Selanjutnya baru dilakukan uji *Repeated Anova* untuk mengetahui adanya perbedaan kadar Ox-LDL plasma yang signifikan diantara kelompok perlakuan. Apabila ditemukan perbedaan yang signifikan pada minimal dua kelompok perlakuan, akan dilanjutkan uji *PostHoc* untuk mengidentifikasi kelompok yang berbeda tersebut.

4.8 Alur Penelitian



