

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 subjek penelitian.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus strain Wistar (*Rattus norvegicus*). Banyak tikus per kelompok ditentukan dengan rumus Federrer (Solimun, 2001):

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

Dengan perincian sebagai berikut:

t = jumlah perlakuan yang diterapkan pada penelitian

r = jumlah dari sampel penelitian

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

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

$$3r - 3 \geq 15$$

$$r \geq 6$$

Jumlah minimal tikus yang digunakan dalam tiap kelompok adalah 6 ekor sesuai dengan rumus Federrer.

Empat kelompok perlakuan yang ada adalah sebagai berikut (masing-masing 20 ekor tikus):

1. Kelompok kontrol
2. Kelompok perlakuan dengan rincian sebagai berikut:
 - a. Kelompok dengan pemberian PsP 300 mg/kgBB
 - b. Kelompok dengan pemberian PsP 600 mg/kgBB
 - c. Kelompok dengan pemberian PsP 1200 mg/kgBB

Sehingga total dari seluruh sampel yang digunakan adalah 80 ekor tikus *Rattus norvegicus* strain wistar dengan masing-masing tikus berusia 6-8 minggu dan memiliki berat 150-300 gram.

4.3 Variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas : dosis PsP yang diberikan ke tiap kelompok tikus
2. Variabel terikat : jumlah leukosit tikus tiap kelompok

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 standar untuk tikus subjek penelitian
2. Spuit 10 cc untuk pengambilan sampel darah tikus
3. Vacutainer EDTA
4. Sonde untuk pemberian peptide polisakarida (PsP) pada tikus.
5. Peralatan pembedahan (papan bedah, jarum pentul, gunting, botol organ)
6. Neraca elektronik untuk menimbang pakan dan berat badan tikus
7. Spatula dan botol untuk melarutkan PsP dengan akuades

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%)
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. Tabung organ untuk memobilisasi organ ke tempat analisis

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini dapat dijelaskan sebagai berikut:

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur (Parameter)	Hasil Ukur	Skala Ukur
Pemberian PsP dari jamur <i>Ganoderma lucidum</i>	Pemberian kapsul PsP yang mengandung ekstrak <i>Ganoderma lucidum</i> 250 mg dengan berat setiap mg mengandung 200 mg β -D-glucan produksi mitra SLH-Labs, Surabaya.	Dosis 300 mg/kgBB, 600 mg/kgBB, dan 1200 mg/kgBB selama 90 hari sesuai berat badan tikus.	mg/KgBB	Rasio
Leukosit	Leukosit tikus dihitung dengan metode <i>Laser Optical Flowcytometry</i> dengan pewarnaan <i>fluorescent</i> .	<i>Automated Hematology Analyzer XN-1000</i>	(1000/uL)	Rasio

4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini diawali dengan pengurusan etik (*ethical clearance*) yang meliputi proposal, formulir layak etik, dan penjelasan etik penelitian. Kemudian dilanjutkan dengan masa aklimatisasi pada tikus subjek penelitian di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama 1 minggu untuk seluruh tikus dengan pakan standar agar tikus mengalami adaptasi

dengan lingkungannya. Pakan diberikan sekali dalam 24 jam kemudian diganti di hari berikutnya. Pakan memiliki berat masing-masing 30 g. Setelah dilakukan masa aklimatisasi terhadap tikus, dilanjutkan dengan proses pengacakan (randomisasi) terhadap tikus untuk dikelompokkan ke dalam masing-masing kelompok perlakuan.

Perlakuan pada tikus diawali dengan pembagian tikus menjadi kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan 1 (PsP dosis 300 mg/kgBB), 2 (PsP dosis 600 mg/kgBB) dan 3 (PsP dosis 600 mg/kgBB). PsP diberikan selama 90 hari dan diakhiri dengan pembedahan. PsP diberikan dengan dosis yang telah ditentukan pada masing-masing kelompok perlakuan (300 mg/kgBB, 600 mg/kgBB, dan 1200 mg/kgBB) per 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 tiap tikus kurang lebih 200 g atau 0.2 kg):
 - a. Kelompok perlakuan 1 : $300 \text{ mg/kgBB} \times 0.2 \text{ kg} = 60 \text{ mg}$
 - b. Kelompok perlakuan 2 : $600 \text{ mg/kgBB} \times 0.2 \text{ kg} = 120 \text{ mg}$
 - c. Kelompok perlakuan 3 : $1200 \text{ mg/kgBB} \times 0.2 \text{ kg} = 240 \text{ mg}$
3. Kebutuhan PsP selama satu minggu untuk setiap kelompok perlakuan :
 - a. Kelompok perlakuan 1 (dosis PsP 300 mg/kgBB)
Polisakarida : $60 \text{ mg} \times 20 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 8400 \text{ mg}$
Air : $1 \text{ ml} \times 20 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 70 \text{ ml}$

Keperluan untuk 1 minggu dengan 100 ml air :

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

b. Kelompok perlakuan 2 (dosis PsP 600 mg/kgBB)

$$\text{Polisakarida} : 120 \text{ mg} \times 20 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 16800 \text{ mg}$$

$$\text{Air} : 1 \text{ ml} \times 20 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 70 \text{ ml}$$

Keperluan untuk 1 minggu dengan 100 ml air :

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

c. Kelompok perlakuan 3 (dosis PsP 1200 mg/kgBB)

$$\text{Polisakarida} : 240 \text{ mg} \times 20 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 33600 \text{ mg}$$

$$\text{Air} : 1 \text{ ml} \times 20 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 70 \text{ ml}$$

Keperluan untuk 1 minggu dengan 100 ml air :

$$100\text{ml}/70\text{ml} \times 33600 \text{ mg} = 48000 \text{ mg}$$

4. Ekstrak dilarutkan dalam 100 ml akuades.
5. Ekstrak diaduk dengan spatula secara manual sampai larutan tercampur merata.

4.8 Pengukuran

Pengukuran jumlah leukosit diukur dari darah tikus. Pengukuran dilakukan di Laboratorium Sentral Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang dengan menggunakan alat *Automated Hematology Analyzer XN-1000*. Pengukuran dilakukan dengan metode *Laser Optical Flowcytometry* dengan pewarnaan fluorescent.

4.9 Analisa Data

Analisis data diawali dengan dengan analisis deskriptif untuk menguji homogenitas dengan menggunakan uji Levene. Setelah diketahui homogenitas data penelitian ($p \geq 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji normalitas dengan uji Kolmogorov-Smirnov untuk mengetahui data penelitian normal atau tidak (bisa dikatakan normal apabila $p \geq 0,05$). Kemudian baru dilakukan uji *One way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan jumlah leukosit yang signifikan antara kelompok perlakuan tikus yang menerima dosis PsP yang berbeda. Apabila ditemukan perbedaan yang signifikan pada minimal dua kelompok perlakuan, akan dilakukan uji PostHoc untuk mengidentifikasi kelompok yang berbeda tersebut.



4.10 Alur Penelitian

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



Pembelian tikus (*Rattus norvegicus* strain wistar) sebanyak 80 ekor (40 ekor jantan dan 40 ekor betina)



Masa aklimatisasi tikus selama 1 minggu



Pengacakan dan pembagian tikus ke dalam 4 kelompok perlakuan, masing masing kelompok 10 ekor jantan dan 10 ekor betina:

- Kelompok Kontrol
- Kelompok Dosis 1 (300 mg/kgBB)
- Kelompok Dosis 2 (600 mg/kgBB)
- Kelompok Dosis 3 (1200 mg/kgBB)



Pemberian PsP selama 90 hari



Pengukuran jumlah leukosit



Analisa data