

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan desain *post test with control group* secara *invivo*, paralel 3 kelompok, menggunakan hewan coba tikus *Sprague Dawley* (SD). Dipilihnya tikus tersebut didasarkan atas beberapa laporan ilmiah terdahulu yang menyebutkan SD merupakan model tepat untuk menginduksi aterosklerosis dengan pemberian diet atherogenik/*high fat diet* (HFD). (Huan Y.,2007, Viswanad B.,2005, Patole. 2004).

Tiga kelompok dalam penelitian ini meliputi kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif (Dislipidemia) serta kelompok perlakuan (Dislipidemia) yang diberikan penghambat selektif Lp-PLA2 (Darapladib/DP) dengan dosis 20 mg/kg berat badan/hari (Wang et al., 2011, Shi et al.,2008). Pengamatan dilakukan secara serial setelah 8 dan 16 minggu pemberian HFD untuk menilai perkembangan awal aterosklerosis pada semua kelompok.

#### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus *Sprague Dawley*. Tikus SD yang digunakan berbobot 150-200 gram, usia 6-8 minggu, jantan, sehat ditandai dengan pergerakan aktif, bulu dan mata bersih diperoleh dari Institut Pertanian Bogor. Untuk memperoleh variabilitas dari tikus yang digunakan sebagai sampel/ulangan penelitian, maka tikus tiap kelompok dipilih dengan cara randomisasi sederhana. Jumlah sampel/ulangan tiap kelompok pada penelitian ini sesuai rumus :

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

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

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

$$r \geq 3+1$$

$$r \geq 4$$

dimana  $t$  = jumlah perlakuan/*treatment* dan  $r$  = jumlah replikasi/ulangan, dengan jumlah perlakuan sebesar 6 sehingga diperoleh jumlah replikasi/ulangan minimal tiap kelompok adalah 4 ekor tikus. Mengingat potensi risiko kematian dan kegagalan yang lebih besar maka ditambahkan antisipasi kegagalan 10% sehingga ditetapkan ulangan sebesar 5 ekor tikus tiap kelompok. Dengan demikian, jumlah keseluruhan sampel/ulangan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 30 ekor tikus.

Tabel 4.1. Alokasi sampel untuk tiap kelompok

Kelompok	Jumlah Ulangan	Macam Diet dan Lama Perlakuan
Normal 8 minggu	5	Diet Standar , 8 minggu
Normal 16 minggu	5	Diet Standar, 16 minggu
Dislipidemia 8 minggu	5	HFD, 8 minggu
Dislipidemia 16 minggu	5	HFD, 16 minggu
Dislipidemia + Darapladib 8 minggu	5	HFD + DP 8 minggu
Dislipidemia + Darapladib 16 minggu	5	HFD+DP 16 minggu

### 4.3 Variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dibagi menjadi :

1. Variabel bebas : Darapladib
2. Variabel terikat : *Intima-media Thickness*

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Lembaga Studi Ilmu Hayati-Pusat Biosains Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Patologi Anatomi (PA) FKUB. Waktu penelitian mulai dari tanggal 6 Oktober 2014 saat pertama kali diberi HFD dan diberikan darapladib. Penelitian diakhiri pada tanggal 11 Februari 2015 ketika tikus terakhir dibedah. Kemudian dilakukan analisis data sesuai parameter yang telah ditentukan.

### 4.5 Alat dan Bahan

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain:

1. Kandang untuk tikus subjek penelitian yaitu kandang standard.
2. Neraca elektronik untuk menimbang sisa pakan tikus.
3. Spuit 1 cc untuk pengambilan sampel darah tikus.
4. Sonde untuk pemberian darapladib pada tikus.
5. Peralatan pembedahan (papan bedah, jarum pentul, gunting, botol organ).



6. Peralatan untuk pencucian dan fiksasi jaringan.
7. Mikroskop dengan embesaran 400 kali untuk pengamatan sediaan aorta.
8. Komputer dengan software *dotslide Olyvia* untuk melakukan pengukuran ketebalan intima-media aorta tikus.

Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

1. Tikus galur Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus*) berusia 6-8 Minggu dengan berat 150-200 gram.
2. Pakan standard tikus.
3. Pakan tinggi lemak (*High Fat Diet*) (PARS 62% dan tepung terigu 20%).
4. Darapladib dengan dosis 20mg/KgBB tikus.
5. Bahan anastesi untuk pembedahan.
6. Formalin untuk pengawetan sediaan aorta.
7. Bahan pewarnaan Oil red O.
8. Pewarnaan Hematoksilin Eosin.
9. Kaca benda untuk fiksasi sediaan aorta.

#### 4.6 Definisi Operasional

Berikut uraian definisi operasional yang digunakan sebagai batasan dalam penelitian ini.

Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
Pemberian Darapladib	Pemberian darapladib secara sonde setiap hari dengan dosis 20 mg/kgBB tikus	mg/kgBB	Rasio
Ketebalan Intima-media aorta	Suatu penebalan yang terjadi pada intima-media pembuluh darah (aorta) yang merupakan hasil interaksi dari kompleks seluler tubuh yang dapat diketahui dari hasil pengecatan HE pada potongan aorta dan diamati dengan menggunakan mikroskop binokuler dengan pembesaran 400x dan diukur ketebalannya menggunakan <i>software OlyVia</i>	$\mu\text{m}$	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 tikus subjek penelitian 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 sehari yang kemudian diganti pada hari berikutnya. Pakan memiliki berat masing-masing 30 gram. Setelah dilakukan aklimatisasi, dilanjutkan ke tahap randomisasi (pengacakan) tikus untuk dikelompokkan ke dalam masing-masing kelompok perlakuan.

Perlakuan pada tikus diawali dengan pembagian tikus ke dalam kelompok kontrol negatif, kontrol positif yang diberikan pakan tinggi lemak selama 8 minggu, kontrol positif yang diberikan pakan tinggi lemak selama 16 minggu, kelompok perlakuan yang diberi pakan tinggi lemak dan darapladib selama 8 minggu, dan kelompok perlakuan yang diberi pakan tinggi lemak dan darapladib selama 16 minggu. Pakan yang diberikan untuk tikus kelompok kontrol positif dan perlakuan adalah pakan tinggi lemak yang memiliki komposisi pakan ayam/ParS 62%, tepung terigu 20%, kolesterol 1%, asam kolat 0,2%, dan kurvet 16,8%. Pakan tinggi lemak diberikan setiap hari selama 8 minggu dan 16 minggu dengan berat masing-masing pakan 26 gram. Darapladib diberikan bersamaan dengan pemberian pakan tinggi lemak hari pertama.



Jumlah kebutuhan darapladib adalah sebagai berikut :

Kelompok DL+DP :  $20 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg} \times 4 \text{ ekor} \times 56 \text{ hari} = 896 \text{ mg}$

$20 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg} \times 5 \text{ ekor} \times 112 \text{ hari} = 2.240 \text{ mg}$

Total kebutuhan = 3.136 mg

#### 4.7.1 Kandang Hewan Coba

Tikus ditempatkan dalam kandang berukuran 40x30x20 cm beserta perlengkapan tempat makan dan minumannya. Kandang terbuat dari *fiber glass*, dilengkapi dengan pengatur suhu dan kelembaban digital. Lantai kandang beralaskan serutan kayu yang telah disterilkan dengan autoklaf pada suhu sekitar 80 °C. Setiap kandang diisi 1 ekor tikus. Tikus-tikus tersebut dipelihara dalam lingkungan dengan perlakuan yang sama yaitu suhu ruangan diatur pada kisaran 24-26 °C, kelembaban  $55 \pm 5 \%$  dengan siklus gelap dan terang masing-masing 12 jam. Tingkat aktivitas fisik tikus dijaga sedemikian rupa agar tetap sama. Kebersihan kandang dijaga setiap hari dan alas kandang diganti setiap 3 hari.

#### 4.7.2 Prosedur Pemberian Darapladib

Setelah 8 minggu diberi pakan tinggi lemak. Selama 8 atau 16 minggu tikus diberi Darapladib sesuai dosis yang telah ditentukan yaitu 20mg per Kg/BB diberikan setiap harinya menggunakan sonde.

#### 4.7.3 Pembedahan Tikus

Setelah 8 atau 16 minggu perlakuan, tikus dieuthanasia menggunakan penyuntikkan ketamin. Setelah tikus tidak sadar, tikus diposisikan pada papan bedah menggunakan *pins*. Dibedah mulai bagian perut menggunakan gunting

bengkok. Setelah itu dilakukan pembedahan tikus untuk mengambil aorta yang dibersihkan menggunakan larutan PBS dan PFA kemudian diawetkan dengan menggunakan formalin 10% dalam botol organ.

#### 4.7.4 Pembuatan Preparat Aorta

Sampel yang diambil adalah potongan arkus 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. Jaringan yang telah difiksasi kemudian diproses dengan menggunakan alat *tissue tex processor*, 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 *Hematoxylin 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.

#### 4.7.5 Pengukuran

Pengukuran ketebalan intima-media (*IMT*) dilakukan setelah pembedahan tikus dengan jaringan yang akan diamati ketebalan intima-mediana adalah



aorta. Pengukuran ketebalan intima-media dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400 x dengan keseluruhan lapang pandang untuk setiap sediaan aorta. Mengukur ketebalan intima-media aorta dengan menarik garis tegak lurus garis terdalam tunika intima dan garis terluar tunika media. Pengukuran dilakukan pada 8 zona, kemudian diambil rata-ratanya (Maliya Arina, 2006).

#### 4.8 Analisis Data

Analisis data diawali 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 Shapiro-Wilk untuk mengetahui data penelitian normal atau tidak (bisa dikatakan normal apabila  $p \geq 0,05$ ). Kemudian baru dilakukan uji *OnewayANOVA* untuk mengetahui pengaruh pemberian darapladib terhadap ketebalan intima-media aorta. Apabila ditemukan perbedaan yang signifikan pada minimal dua kelompok perlakuan, akan dilakukan uji PostHoc untuk mengidentifikasi kelompok yang berbeda tersebut.

4.9 Alur Penelitian

