

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan setelah memperoleh izin dari Panitia Tetap Etik Penelitian Kedokteran/Kesehatan FKUB..

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true eksperimental* dengan desain penelitian *Randomized Only Post Test Controlled Group* secara *in vivo*, paralel 6 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 aterogenik/*high fat diet* (HFD). SD adalah model non-genetik (*transgenic*) yang tepat pula untuk memperlihatkan perjalanan alamiah munculnya resistensi insulin dan Diabetes Mellitus tipe 2 seperti pada manusia melalui induksi dengan HFD dan *streptozotocin* (STZ) dosis rendah.

Enam kelompok dalam penelitian ini meliputi dua kelompok kontrol negatif, dua kelompok kontrol positif (Diabetes mellitus tipe 2) serta dua kelompok perlakuan (Diabetes Mellitus tipe 2 yang diberikan penghambat selektif Lp-PLA2 (Darapladib/DP) dengan dosis 20 mg/kg berat badan/hari. Pengamatan dilakukan secara serial setelah 8 dan 16 minggu pemberian PS/HFD untuk menilai perkembangan awal aterosklerosis pada semua kelompok.

#### 4.2 Populasi Penelitian dan Besar Sampel

Sampel yang digunakan adalah tikus Spraguw Dawley (SD). 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. Banyak tikus berkelompok ditentukan dengan rumus Federrer.

Perhitungan besarnya sampel adalah sebagai berikut (Ridwan, 2013) :

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

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

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

$$r \geq 3+1$$

$$r \geq 4$$

t = jumlah kelompok perlakuan/*treatment* dan r = jumlah replikasi/ulangan,

Berdasarkan rumus diatas, jumlah minimal tikus yang digunakan dalam tiap kelompok adalah 4 ekor. Kemudian ditambahkan satu ekor lagi sehingga berjumlah 5 ekor untukantisipasi bila ada tikus yang mati pada saat penelitian berlangsung. Dengan demikian, jumlah keseluruhan sampel yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 30 ekor tikus

Enam kelompok perlakuan adalah sebagai berikut (masing-masing 5 ekor tikus) :

1. Kelompok N 8
2. Kelompok N 16
3. Kelompok DM 8
4. Kelompok DM 16
5. Kelompok DMDP 8
6. Kelompok DMDP 16

#### 4.2.1 Kriteria Sampel

##### 4.2.1.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus berjenis kelamin jantan
- b. Umur 6-8 minggu
- c. Berat badan sekitar 150-200 gram
- d. Kondisi sehat dan tidak ada kelainan anatomi

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dibagi menjadi

1. Variabel bebas : Darapladib
2. Variabel terikat : Ketebalan tunika intima media

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 4.4.1 Lokasi Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Biosains (LSIH) Universitas Brawijaya dan pengukuran ketebalan tunika intima media dilaksanakan di laboratorium Patologi Anatomi FKUB.

##### 4.4.2 Waktu Penelitian

Waktu dimulainya penelitian adalah 25 Agustus 2015 yang mana adalah waktu kedatangan tikus di laboratorium dan juga dimulainya masa aklimatisasi tikus. Penelitian diakhiri pada Maret 2016 yang merupakan periode analisis data hasil penelitian sesudah pengamatan hasil parameter penelitian.

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain:

1. Kandang untuk tikus subjek penelitian berukuran 40x30x20 cm beserta perlengkapan tempat makan dan minumnya.
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 untuk pembedahan (gunting bedah, pinset, jarum pentul, kapas, dan botol organ)
6. Peralatan untuk pencucian dan pembedahan
7. Peralatan untuk mengukur ketebalan tunika intima media menggunakan mikrosko dengan *software scan dot slide olyVia* dengan pembesaran 40x. Diukur menggunakan dengan satuan  $\mu\text{m}$  sebanyak 8x pengulangan pengukuran tiap sampel.

Sedanglan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Tikus *Sprague Dawley* berusia 6-8 minggu dengan berat 150-200 gram
2. Pakan standart tikus
3. Pakan HFD berisi PARS 62 %, tepung terigu 20%, kolsterol 1%, asam kolat 0,2%, dan korsvet 16,8%
4. Darapladib dengan dosis 20mg/KgBB
5. Bahan untuk pembedahan (ketamin, formalin 10%, dan alkohol)
6. Formalin untuk pengawetan sediaan aorta
7. Bahan untuk pembuatan preparat tunika intima media aorta pada tikus (formalin 10%, etanol 80%, etanol 90%, etanol absolut, xylol, paraffin, alkohol 70%, dan *hematoxilin-eosin* (HE))

## 4.6 Definisi Operasional

Variabel	Defini Operasional	Parameter	Hasil Ukur	Skala Ukur
Pemberian Darapladib	Darapladib merupakan lipofilik yang menghambat substrat Lp-PLA2 pada plasma dan LDL, berikatan dengan LP-PLA2. Merupakan obat yang dikembangkan oleh GlaxoSmith Kline	Dosis 20mg/KgBB selama 8 minggu dan 16 minggu setelah pemberian HFD 8 minggu.	mg/KgBB	(-)
Tunika Intima Media	Penebalan lapisan dinding pembuluh darah aorta ke arah lumen yang diketahui dari hasil pengecatan HE	Teridentifikasi dari tebal lapisan otot polos vaskular yang diukur dari tunika intima hingga batas tunika media dengan tunika	µm	Rasio

		adventisia dari hasil scan.	
Model Diabetes Mellitus tipe 2	Diabetes Mellitus tipe 2 merupakan kelainan metabolik yang dikarakteristik dengan keadaan hiperglikemia kronis, yang dikarenakan adanya resistensi kerja insulin pada jaringan yang juga dikarenakan sekresi insulin yang inadekuat. Untuk memastikan model tikus DM tipe 2 dilakukan pemeriksaan gula darah, insulin plasma, dan profil lipid di LSIH. Kemudian resistensi insulin dihitung dengan program <i>microsoft excel</i>		

## **4.7 Prosedur Penelitian**

### **4.7.1 Membuat Surat Kelayakan Etik**

Pengurusan Etik penelitian dilaksanakan dengan pengajuan proposal yang kemudian akan dievaluasi oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### **4.7.2 Persiapan Hewan Coba**

Membuat persiapan pemeliharaan hewan coba, dimulai dengan persiapan alat dan bahan penelitian dan dilakukan seleksi tikus berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Tikus sebelumnya diaklimatisasi atau diadaptasikan selama 2 minggu dengan diberi pakan normal yang terdiri dari PARS, tepung terigu, dan air. Diet diberikan pada siang hari pukul 12.00-14.00. Sisa pakan kemudian diambil dan ditimbang setelah 24 jam. Hasilnya kemudian dihitung sebagai rata-rata asupan pakan harian tikus/kelompok/hari. Setelah dilakukan aklimatisasi, dilakukan proses pengacakan (randomisasi) terhadap tikus untuk dikelompokkan ke dalam masing-masing kelompok.

### **4.7.3 Pembagian Kelompok Perlakuan**

Jenis perlakuan dibagi berdasarkan kelompok tikus yang telah ditentukan sebelumnya. Ada 6 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif yang diberi pakan standart 8 minggu dan 16 minggu, kontrol positif yang diberikan HFD dan injeksi STZ selama 8 minggu, kontrol positif yang diberikan HFD dan injeksi STZ selama 16 minggu, kelompok perlakuan HFD, injeksi STZ, dan darapladib selama 8 minggu, dan kelompok perlakuan HFD, STZ, dan Darapladib selama 16 minggu.

#### 4.7.4 Pembuatan Pakan yang Diberikan pada Tikus

##### 4.7.4.1 Pakan Standar

Pakan standar diberikan selama masa aklimatisasi untuk semua kelompok dan untuk kelompok kontrol negatif selama. Diet normal yang digunakan berupa AIN-93 (*American Institute of Nutrition*) dengan kandungan air, tepung terigu, kasein, vitamin, mineral, kolin, dan gelatin. Diet normal diberikan selama 1 minggu pertama sebagai tahap adaptasi tikus kontrol positif dan tikus pada 2 kelompok perlakuan. Pakan Standart mengandung total energi Kalori (kcal/gram) sebesar 3,43 (karbohidrat 67 %, protein 21% dan lemak 12 %). Pakan Standar yang diberikan memiliki komposisi sebagai berikut.

**Tabel 4.1 Komposisi Pakan Standart**

Tepung Jagung	620 gram
Gula Pasir	100 gram
Soybean Oil	40 gram
Gelatine	65 gram
Casein	80 gram
CMC	50 gram
Mineral	35 gram
Vitamin	10 gram
<b>Total</b>	<b>1000 gram</b>

##### 4.7.4.2 Pakan Aterogenik ( *High Fat Diet* )

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. HFD mengandung total energi Kalori sebesar 5,29 (58% lemak, 17% karbohidrat dan 25% protein).

Jumlah kebutuhan darapladib adalah sebagai berikut :

$$\text{Kelompok DM+DP} : 20 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg} \times 5 \text{ ekor} \times 56 \text{ hari} = 1120 \text{ mg}$$

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

$$\text{Total kebutuhan} = 3.360 \text{ mg}$$

**Tabel 4.2 Komposisi Pakan HFD**

Bahan Pakan	Berat (gram)
Tepung	200
PAR-S	620
Kolesterol	10
Asam Kolat	2
Kurvet	168
<b>Total</b>	<b>1000</b>

#### 4.7.5 Pembuatan Tikus Model Diabetes Mellitus tipe 2

Setelah aklimatisasi, selama 4 minggu tikus diberi HFD. Kemudian diinduksi dengan STZ intraperitoneal dngan dosis tinggi 60 mg/KgBB. Dilanjutkan kembali 4 minggu dengan diet tinggi lemak.

#### 4.7.6 Pembedahan Tikus

Setelah 8 atau 16 minggu perlakuan, tikus dieuthanasia menggunakan penyuntikan ketamin. Setelah tikus tidak sadar, tikus diposisikan pada papan bedah menggunakan pins. Dibedah mulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok. Setelah itu, dilakukan pembedahan tikus untuk mengambil aorta yang dibersihkan dengan larutan PBS dan PFA kemudian diawetkan dengan menggunakan formalin 10%.

#### 4.7.7 Pembuatan Preparat Aorta

Sampel yang diambil adalah potongan aorta tikus. Aorta yang telah diambil dari tikus kemudian dipotong dengan ketebalan  $\pm 2-3$  mm dan kemudian dimasukkan kedalam 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  $60^{\circ}$  C, lalu dimasukkan kedalam larutan xylol selama 15 menit, alkohol 96% selama 3 menit, dan kemudian dicuci bersih dengan air mengalir selama 10 menit. Jaringan kemudian siap diberi HE selama 10-15 menit, lalu dicuci kembali dengan air mengalir selama 15 menit. Masukkan ke dalam alkohol asam 1% sebanyak 2-5 celup, lalu kedalam amoniak air 3-5 celup. Setelah itu diberi cat pembeding eosin 1% selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi dengan memasukkan kedalam alkohol 80% selama 3 menit dan alkohol 96% selama 3 menit. Kemudian dilakukan penjernihan dengan larutan xylol selama 15 menit sebanyak 2 kali, lalu mounting dengan entelen dan deck glass. Preparat siap digunakan.

#### 4.7.8 Pengukuran Ketebalan Intima Media

Ketebalan intima media diukur dengan melakukan pengamatan pada preparat aorta. Preparat aorta discan terlebih dahulu dengan mikroskop dengan pembesaran 400x, kemudian dilihat dan diukur dengan menggunakan software Scan Dot Slide Olyvia pada komputer. Ketebalan intima media pada setiap sampel diukur sebanyak delapan zona serta dihitung rata-rata dari kedelapan zona tersebut. Sehingga didapatkan rata-rata ketebalan intima media.

Pengukuran ketabaln intima media dilakukan dengan cara double blind, yaitu dihitung dengan dua pemeriksa sehingga dapat dipastikan hasilnya objektif.

#### 4.8 Uji Analisis 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:

- a. 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. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal maka digunakan uji parametrik, sedangkan jika sebaran data tidak normal digunaka uji non parametrik. Uji normalitas yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji Shapiro-Wilk karena jumlah sampel yang digunakkan pada penelitian ini kurang dari 50 ( $n \leq 50$ ). Data dikatakan memiliki persebaran normal jika  $p > 0,05$ .
- b. 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 signifikansi  $p > 0,05$ .

- c. Uji ANNOVA : untuk membandingkan rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan. Perbedaan pada dua kelompok dianggap bermakna bila  $p < 0,05$ .
- d. Uji Post Hoc : Bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan dari hasil tes uji ANOVA. Uji Post Hoc yang digunakan adalah Duncan dengan tingkat signifikasi 95% ( $p < 0,05$ ).



### 4.9 Alur Penelitian

