

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

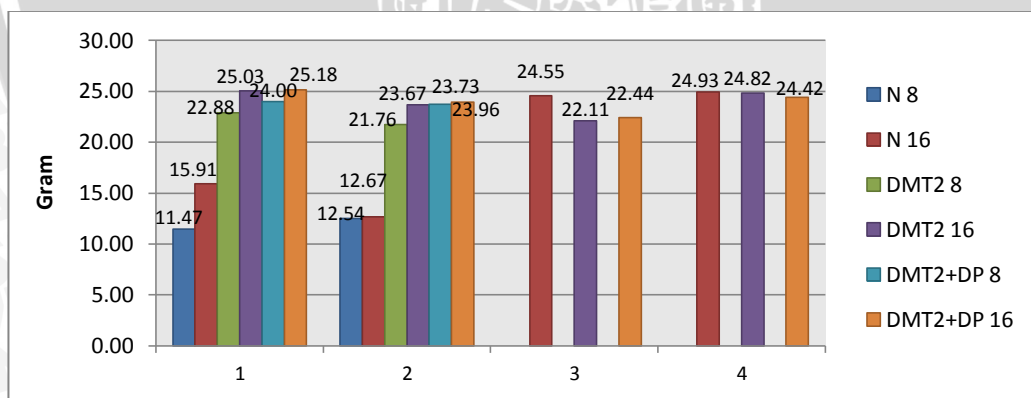
Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian Darapladib terhadap pembentukan sel busa tikus model aterosklerosis diabetes mellitus tipe 2.

5.1. Hasil Penelitian

Berikut disajikan data pendukung yang terdiri dari asupan pakan, perubahan berat badan tikus, kadar glukosa darah, kadar insulin plasma, dan resistensi insulin.

5.1.1. Asupan Pakan Tikus

Asupan pakan tikus dihitung setiap hari dengan mengurangi jumlah yang diberikan, yakni sebesar 26 gram dengan jumlah sisa pakan. Dibawah ini disajikan grafik rata-rata asupan pakan tikus pada setiap kelompok percobaan tiap bulan.



Gambar 5.1 Grafik Rata-rata Asupan Pakan pada Setiap Kelompok Tikus Sprague-Dawley (gram)

Gambar 5.1 menunjukkan grafik rata-rata asupan pakan tikus *Sprague Dawley* setiap kelompok pada tiap bulan. Kelompok normal dengan durasi perlakuan 8 dan 16 minggu mendapatkan pakan standar, sedangkan

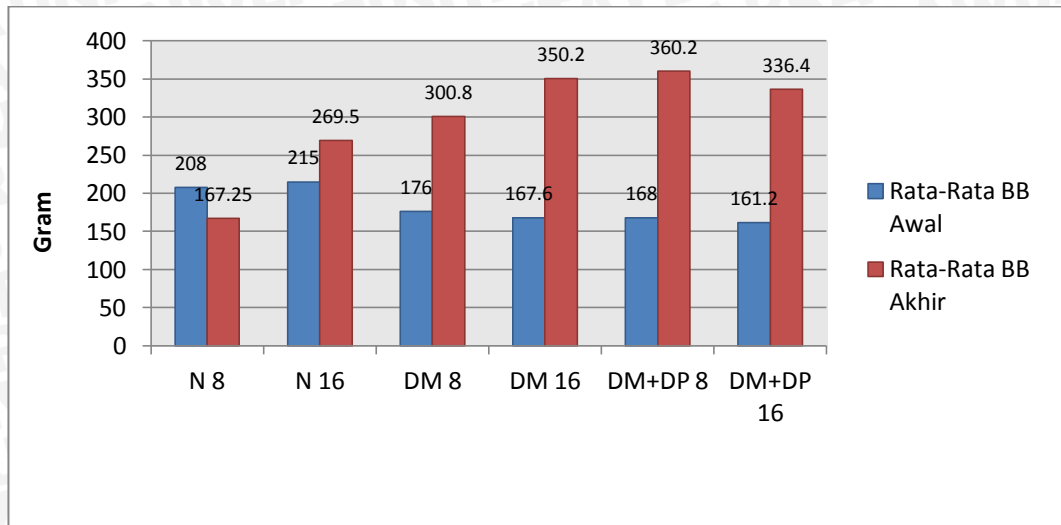


kelompok DM 8 minggu dan 16 minggu, serta DM 8 dan 16 minggu yang diberi terapi Darapladib diberi pakan HFD.

Secara keseluruhan, kelompok tikus model DM+DP 16 minggu memiliki rata-rata jumlah asupan pakan tertinggi sebanyak 24 g, sedangkan rata-rata asupan pakan paling rendah dimiliki oleh kelompok tikus normal 8 minggu sebesar 12 g. Pada bulan pertama asupan pakan paling tinggi adalah kelompok tikus DM+DP 16 minggu sebesar 25,18 g, sedangkan kelompok dengan konsumsi pakan terendah adalah tikus normal 8 minggu sebesar 11,47 g. Pada bulan kedua asupan pakan paling tinggi dimiliki oleh kelompok DM+DP 16 minggu sebesar 23,96 g, dan asupan terendah dimiliki oleh kelompok normal 8 minggu sebanyak 12,54 g. Rata-rata asupan pakan terbanyak pada bulan ketiga dimiliki oleh kelompok normal 16 minggu sebesar 24,55 g, sedangkan rata-rata terendah dimiliki kelompok DM 16 minggu sebanyak 22,11 g. Pada bulan keempat, rata-rata terbanyak didapatkan pada kelompok normal 16 minggu sebesar 24,93 g, sedangkan rata-rata terendah dimiliki kelompok DM+DP 16 minggu sebesar 24,42 g.

5.1.2 Perubahan Berat Badan Tikus

Pemberian pakan tinggi lemak bertujuan untuk meningkatkan kadar kolesterol dan lemak dalam darah tikus dan menginduksi terjadinya sindroma metabolik. Efek langsung pemberian diet tinggi lemak pada tikus *Sprague Dawley* dapat diamati melalui pengukuran berat badan (BB) tikus. Pengukuran BB tikus dilakukan sebelum pemberian HFD yaitu berat badan setelah masa aklimatisasi dan diukur kembali secara serial dalam rentang waktu 8 dan 16 minggu pada masing-masing kelompok. Berikut ini adalah grafik rata-rata peningkatan berat badan tikus pada kelompok normal, kelompok DM, dan kelompok DM yang diberi Darapladib selama 8 dan 16 minggu.



Gambar 5.2 Grafik Rata-rata Perubahan Berat Badan pada Setiap Kelompok Tikus Sprague-Dawley (gram)

Gambar 5.2 menunjukkan rata-rata penimbangan berat badan tikus pada awal masa perlakuan dan akhir sebelum pembedahan 8 dan 16 minggu. Setiap kelompok tikus mengalami penambahan berat badan kecuali kelompok normal 8 minggu yang mengalami penurunan berat badan. Rata-rata awal berat badan kelompok normal 8 minggu adalah 208 g dan menurun hingga sebesar 40,75 g menjadi 167,25 g. Pada kelompok normal 16 minggu pengukuran berat badan rata-rata awal adalah 215 g dan pada akhir pengukuran didapatkan rata-rata berat badan menjadi 269,5 g. Pada kelompok DM 8 minggu, didapatkan rata-rata berat badan awal sebesar 176 g dengan berat badan akhir sebelum pembedahan sebesar 269,5 g. Rata-rata berat badan kelompok DM 16 minggu pada awal pengukuran sebesar 167,6 g, kemudian pada pengukuran akhir didapatkan peningkatan berat badan menjadi 350,2 g. Pada kelompok DM+DP 8 minggu didapatkan rata-rata berat badan awal sebesar 168 g, sedangkan pada pengukuran berat badan akhir menjelang pembedahan didapatkan rata-rata sebesar 360,2 g. Kemudian

pada kelompok DM+DP 16 minggu didapatkan rata-rata berat badan awal tikus sebesar 161,2 g dan mengalami peningkatan rata-rata berat badan menjadi 336,4 g pada akhir pengukuran.

5.1.3 Kadar Glukosa Darah, Kadar Insulin Plasma, dan Resistensi Insulin

Untuk mengetahui keberhasilan dalam membuat model DM tipe 2 pada penelitian ini, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah, kadar insulin plasma, dan resistensi insulin. Pengukuran kadar glukosa darah menggunakan glukometer GlucoDr Co.Ltd. Korea dengan meneteskan darah dari ujung ekor tikus pada *glucostick*. Pengukuran konsentrasi insulin tikus dilakukan dengan menggunakan metode *Sandwich* ELISA dengan Rat INS (insulin) ELISA kit (Cat. No. E-EL R2466). Hasil pengukuran kadar glukosa darah puasa pada tiap kelompok tikus dapat dilihat pada tabel 5.1.berikut ini:

Tabel 5.1 Tabel Rata-rata Kadar Glukosa Darah Puasa pada Setiap Kelompok Tikus *Sprague-Dawley*

Kelompok	Normal		DM		DM + DP	
	8 Minggu	16 Minggu	8 Minggu	16 Minggu	8 Minggu	16 Minggu
Kadar Gula Darah Puasa (mg/dL) ($\bar{x} \pm SD$)	91,6 \pm 7,16	79,6 \pm 14,63	128 \pm 15,01	147,8 \pm 58,22	103,2 \pm 13,72	101,8 \pm 19,07

Dari tabel diatas didapatkan bahwa rata-rata kadar glukosa darah tertinggi didapatkan pada kelompok DM 16 minggu sebesar 147,8 mg/dL. Pengukuran kadar insulin plasma darah tikus diukur menggunakan *sandwich* ELISA menggunakan Rat INS (insulin) ELISA kit (Cat. No. E-EL-R2466). Hasil pengukuran dinyatakan dalam satuan ng/mL dan dilakukan konversi satuan menjadi IU/L menggunakan rumus WHO dengan cara membaginya dengan 0,0347, hal ini berdasarkan pada persamaan 1 IU yang ekuivalen dengan

0,0347 mg/L (Burns *et al.*, 2010). Hasil pengukuran kadar rata-rata insulin tertinggi didapatkan pada kelompok DM 16 minggu sebesar 11,2 IU/L.

Pengukuran resistensi insulin dilakukan berdasarkan rumus HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance*) untuk model hewan coba tikus, perhitungan dilakukan menggunakan data rata-rata pengukuran kadar glukosa darah puasa dan kadar insulin plasma dengan formulasi perhitungan sebagai berikut (Van Dijk *et al.*, 2013) :

$$HOMA-IR = \frac{FBS \times FINS}{14,1}$$

Keterangan :

HOMA-IR : *Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance*
FBG : *Fasting Blood Glucose* (Glukosa Darah Puasa) (mmol/L)
FINS : *Fasting Insulin Plasma* (Insulin Plasma Puasa) (IU/L)

Berdasarkan hasil perhitungan Interpretasi HOMA-IR pada hewan coba tikus, interpretasi hasil perhitungan dinyatakan bahwa tikus mengalami resistensi insulin apabila hasilnya mencapai $>1,716$ dengan sensitivitas 83,87% dan spesifisitas 80,56% (95% *confidence interval*) (Cacho *et al.*, 2008). Dari rumus tersebut, kelompok tikus DM 16 minggu memiliki nilai HOMA-IR paling tinggi sebesar $6,458 \pm 0,60$ dan dinyatakan resisten insulin.

5.1.4 Analisis Deskriptif Rata-rata Pengukuran Profil Lipid pada Tikus

Pada penelitian ini, pemberian pakan tinggi lemak (HFD) bertujuan untuk menginduksi dislipidemia sehingga memicu kondisi sindroma metabolik. Kondisi dislipidemia pada tikus dievaluasi melalui pengukuran profil lipid yang terdiri dari konsentrasi kolesterol total, HDL, dan LDL/VLDL dengan metode kolorimetri menggunakan EnzymChrom AF HDL and LDL/VLDL Assay kit

(E2HL-100). Hasil pengukuran profil lipid pada setiap kelompok tikus disajikan dalam Tabel 5.2 berikut:

Tabel 5.2 Tabel Rata-rata Kadar Profil Lipid pada Setiap Kelompok Tikus Sprague-Dawley

Kelompok	Normal		DM		DM + DP	
	8 Minggu	16 Minggu	8 Minggu	16 Minggu	8 Minggu	16 Minggu
Kolesterol Total (mg/dL) ($\bar{x} \pm SD$)	72,79 $\pm 4,045$	56,56 $\pm 5,43$	123,00 $\pm 2,8$	111,72 $\pm 7,29$	97,96 $\pm 1,70$	98,85 $\pm 3,249$
Kadar HDL (mg/dL) ($\bar{x} \pm SD$)	34,73 $\pm 8,31$	35,76 $\pm 1,67$	4,95 $\pm 0,41$	13,96 $\pm 0,87$	15,93 $\pm 1,21$	20,79 $\pm 2,76$
Kadar LDL/VLDL (mg/dL) ($\bar{x} \pm SD$)	49,83 $\pm 5,06$	19,24 $\pm 3,67$	95,53 $\pm 8,66$	88,24 $\pm 6,22$	85,91 $\pm 6,83$	61,51 $\pm 6,03$

Dari tabel tersebut didapatkan bahwa kelompok DM 8 minggu memiliki kadar kolesterol total paling tinggi dibandingkan dengan kelompok lain dengan nilai sebesar 111,72 $\pm 7,29$ mg/dL. Sedangkan nilai terendah didapatkan pada kelompok normal 16 minggu, yakni sebesar 56,56 $\pm 5,43$ mg/dL. Selain itu, kelompok normal 16 minggu memiliki kadar HDL tertinggi sejumlah 35,76 $\pm 1,67$ mg/dL. Sementara itu kadar HDL terendah didapatkan pada kelompok DM 8 minggu, dengan nilai sebesar 4,95 $\pm 0,41$ mg/dL.

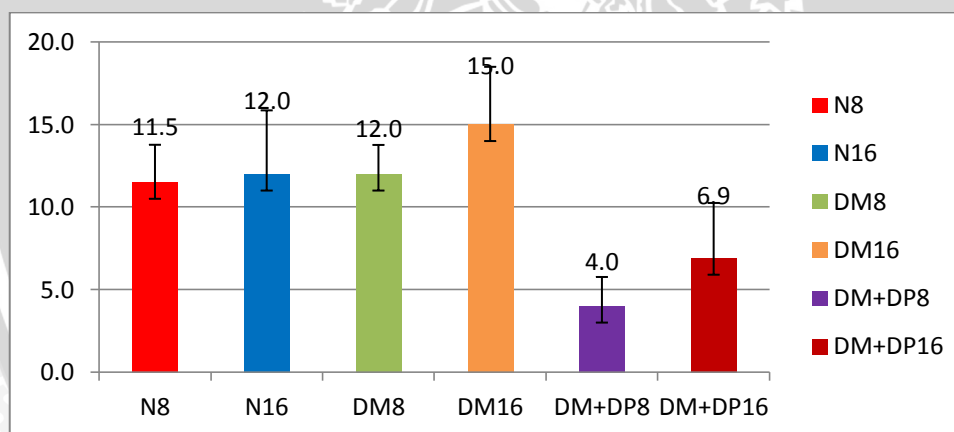
Sama halnya dengan kadar kolesterol total, kadar LDL/VLDL tertinggi didapatkan pada kelompok DM 8 minggu, yakni sebesar 95,53 $\pm 8,66$ mg/dL. Sedangkan kadar terendah dimiliki oleh kelompok normal 16 minggu dengan nilai sebesar 19,24 $\pm 3,67$ mg/dL.

5.1.5 Analisis Deskriptif Rata-rata Pengukuran Jumlah Sel Busa (*Foam cell*) pada Tikus

Penghitungan jumlah sel busa dilakukan setelah pembuatan preparat menggunakan proses *paraffin block* dengan metode pengecatan *Hematoxylin-Eosin* (HE). Penghitungan dilakukan secara manual. Berikut merupakan data rata-rata jumlah sel busa pada setiap kelompok dalam Gambar 5.3 dan Tabel 5.3 :

Tabel 5.3 Rata-rata Jumlah Sel Busa pada Setiap Kelompok Tikus *Sprague-Dawley*

Kelompok	Normal		DM		DM + DP	
	8 Minggu	16 Minggu	8 Minggu	16 Minggu	8 Minggu	16 Minggu
Sel busa (sel/aorta) ($\bar{x} \pm SD$)	11,5 \pm 2,27	12,0 \pm 3,86	12,0 \pm 1,76	15,0 \pm 3,50	4,0 \pm 1,76	6,9 \pm 3,35



Gambar 5.3 Grafik Rata-rata Jumlah Sel Busa pada Setiap Kelompok Tikus *Sprague-Dawley* (sel/aorta)

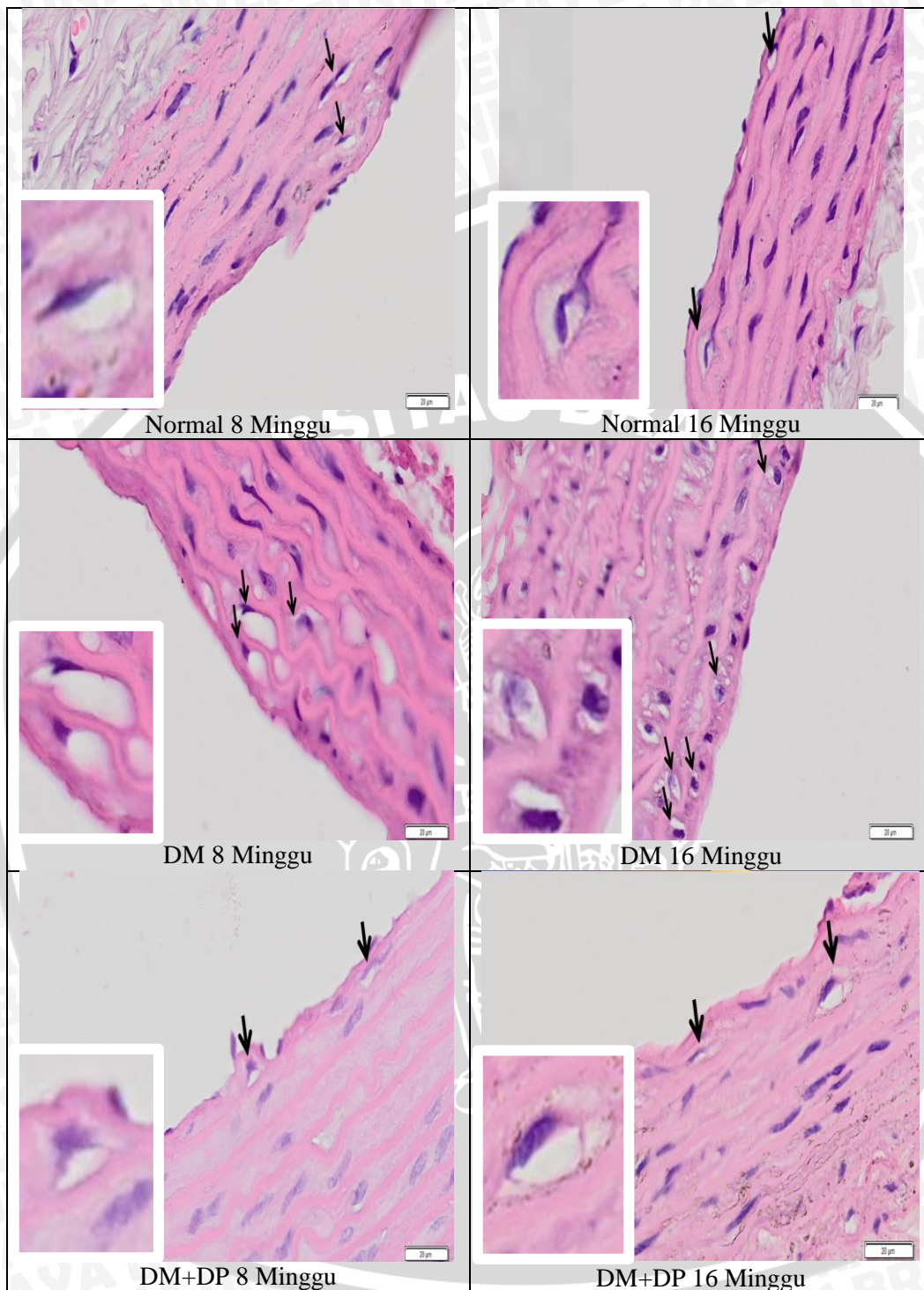
Berdasarkan grafik diatas didapatkan bahwa pemberian Darapladib dapat menurunkan jumlah sel busa pada aorta tikus *Sprague-Dawley*. Kelompok DM+DP 8 minggu memiliki rata-rata jumlah sel busa sebanyak 4 \pm 1,76 sel/aorta, jumlah ini lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (kelompok DM) pada serial waktu yang sama yakni 8 minggu dengan rata-rata jumlah sel sebanyak 12 \pm 1,76 sel/aorta. Penurunan jumlah sel

busa juga terjadi pada kelompok tikus DM yang diberikan Darapladib selama 16 minggu dibandingkan dengan kelompok DM 16 minggu. Kelompok DM+DP 16 minggu memiliki rata-rata jumlah sel busa sebanyak $6,9 \pm 3,35$ sel/aorta. Sedangkan pada kelompok DM 16 minggu terdapat $16,5 \pm 4,17$ sel/aorta.

Pada kelompok normal 8 minggu rata-rata jumlah sel busa yang didapatkan adalah $11,5 \pm 2,27$ sel/aorta. Jumlah ini meningkat pada serial waktu 16 minggu sebanyak $12 \pm 3,86$ sel/aorta. Pada kelompok DM juga terjadi peningkatan antar serial waktu. Kelompok DM 8 minggu memiliki rata-rata jumlah sel busa $12 \pm 1,76$ sel/aorta dan sebanyak $15 \pm 3,50$ pada kelompok DM 16 minggu. Pada kelompok dengan pemberian Darapladib, rata-rata jumlah sel busa terendah didapatkan pada kelompok dengan masa perlakuan 8 minggu yakni sebesar $4 \pm 1,76$ sel/aorta. Sedangkan pada kelompok 16 minggu rata-rata jumlah sel busa adalah sebanyak $6,9 \pm 3,35$ sel/aorta.

Secara keseluruhan rata-rata jumlah sel busa terendah didapatkan pada kelompok DM+DP 8 minggu dengan jumlah sebesar $4 \pm 1,76$ sel/aorta, sedangkan jumlah tertinggi didapatkan pada kelompok kontrol positif 16 minggu, yakni sebanyak $16,5 \pm 4,17$ sel/aorta.

Penghitungan jumlah sel busa dilakukan melalui pengamatan secara histopatologi menggunakan pengecatan HE dengan perbesaran 400 kali menggunakan mikroskop dan software Dot Slide Olyvia™. Sel busa teridentifikasi sebagai sel dengan sitoplasma pucat dan inti berwarna biru atau merah pada tunika intima. Berikut adalah gambaran histopatologi aorta tikus *Sprague-Dawley* pada setiap kelompok :



Gambar 5.4 Gambaran Histopatologi Hematoksin Eosin Sel Busa pada Setiap Kelompok Tikus *Sprague-Dawley*

Keterangan : Menggunakan Scan Dot Slide Olyvia™ dengan perbesaran 400x. Panah hitam menunjukkan sel busa.

5.2 Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam rata-rata \pm simpangan baku (mean \pm SD). Kemudian, dilakukan analisis data parametrik menggunakan program analisis statistik IBM SPSS versi 23 dengan uji *repeated* ANOVA setelah memenuhi uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan metode *Saphiro-Wilk* menghasilkan nilai probabilitas (p) sebesar $>0,05$ maka diambil kesimpulan bahwa data yang diperoleh berdistribusi normal. Uji homogenitas menggunakan metode Levene test menunjukkan angka $p>0,05$, sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa data memiliki varians yang tidak berbeda secara bermakna. Uji beda dilakukan menggunakan metode *repeated* ANOVA dengan hasil nilai signifikansi yang diperoleh adalah $<0,05$ sehingga data memiliki perbedaan yang bermakna. Kemudian, analisis data dilanjutkan menggunakan metode *Post-Hoc* LSD untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian Darapladib pada seluruh kelompok penelitian.

5.2.1 Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data memiliki distribusi normal atau tidak secara analitis. Suatu data disebut berdistribusi normal apabila nilai $p>0,05$. Pada data dengan distribusi normal, maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran serta menggunakan uji parametrik. Pada penelitian ini digunakan metode uji normalitas *Saphiro-Wilk* yang merupakan metode yang tepat untuk jumlah data kurang dari lima puluh. Dari uji normalitas yang dilakukan didapatkan hasil sebaran data sel busa adalah $p>0,05$. Dengan

demikian sebaran data sel busa pada seluruh kelompok adalah normal. Hasil uji normalitas disajikan dalam tabel 5.4 berikut:

Tabel 5.4 Hasil Uji Normalitas Rata-rata Jumlah Sel Busa pada Setiap Serial Waktu 8 dan 16 Minggu

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Foam Cell 8 Minggu	.176	15	.200*	.924	15	.224
Foam Cell 16 Minggu	.168	15	.200*	.947	15	.483

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

5.2.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas (*Levene's test*) digunakan untuk mengetahui apakah ada dua atau lebih kelompok data yang memiliki varians sama atau tidak. Apabila varians data sama, maka data memenuhi syarat untuk dilanjutkan dengan uji ANOVA. Hasil uji homogenitas yang didapatkan untuk kelompok sel busa 8 minggu adalah $p=0,336$ dan $p=0,308$ untuk kelompok sel busa 16 minggu. Hasil *significancy test of homogeneity of variances* pada dua periode waktu menunjukkan $p>0,05$, hal ini menunjukkan bahwa varians data adalah homogen secara signifikan. Hasil Levene test dipaparkan pada tabel 5.5 berikut:

Tabel 5.5 Hasil Uji Homogenitas Varians Rata-rata Jumlah Sel Busa pada Serial Waktu 8 dan 16 Minggu

		Levene			
		Statistic	df1	df2	Sig.
Foam Cell 8 Minggu	Based on Mean	1.197	2	12	.336
	Based on Median	.366	2	12	.701
	Based on Median and with adjusted df	.366	2	10.816	.702
	Based on trimmed mean	1.119	2	12	.359
Foam Cell 16 Minggu	Based on Mean	1.300	2	12	.308
	Based on Median	.635	2	12	.547
	Based on Median and with adjusted df	.635	2	11.823	.547
	Based on trimmed mean	1.265	2	12	.317

5.2.3 Uji *Repeated* ANOVA

Uji *repeated* ANOVA dilakukan untuk melihat perbedaan pada suatu data dengan jumlah data berpasangan yang lebih dari dua dan memiliki distribusi data normal. Hasil perbandingan data jumlah sel busa pada dua periode waktu 8 dan 16 minggu dengan metode *repeated* ANOVA menunjukkan nilai $p < 0,05$ dengan tingkat kepercayaan 95%. Dengan demikian pemberian Darapladib dapat menurunkan jumlah sel busa pada kelompok perlakuan secara signifikan. Hasil uji *repeated* ANOVA disajikan dalam tabel 5.6 berikut ini:

Tabel 5.6 Hasil Uji *Repeated ANOVA* Rata-rata Jumlah Sel Busa pada Serial Waktu 8 dan 16 Minggu

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Waktu	Sphericity Assumed	86.700	1	86.700	20.731	.000
	Greenhouse-Geisser	86.700	1.000	86.700	20.731	.000
	Huynh-Feldt	86.700	1.000	86.700	20.731	.000
	Lower-bound	86.700	1.000	86.700	20.731	.000
Error(Waktu)	Sphericity Assumed	58.550	14	4.182		
	Greenhouse-Geisser	58.550	14.000	4.182		
	Huynh-Feldt	58.550	14.000	4.182		
	Lower-bound	58.550	14.000	4.182		

5.2.4 Uji *Post-Hoc*

Uji *Post-Hoc* dilakukan untuk menentukan kelompok mana yang memiliki perbedaan bermakna setelah uji ANOVA. Uji *Post-Hoc* yang digunakan adalah LSD dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil uji *Post-Hoc* LSD dipaparkan dalam tabel 5.5 berikut ini :

Tabel 5.7 Hasil Uji *Post-Hoc* Rata-rata Jumlah Sel Busa Setiap Kelompok Serial Waktu 8 dan 16 Minggu dengan Metode LSD

	N8	N16	DM8	DM16	DM+DP8	DM+DP16
N8	-	0,112	0,112	0,000	0,005	0,188
N16	0,112	-	1,000	0,014	0,000	0,006
DM8	0,112	1,000	-	0,014	0,000	0,006
DM16	0,000	0,014	0,014	-	0,000	0,000
DM+DP8	0,005	0,000	0,000	0,000	-	0,101
DM+DP16	0,188	0,006	0,006	0,000	0,101	-

Keterangan :

Nilai $p < 0,05$ (berwarna biru) : terdapat perbedaan signifikan antara dua kelompok yang dibandingkan

Nilai $p > 0,05$ (berwarna merah) : tidak terdapat perbedaan signifikan antara dua kelompok yang dibandingkan

Hasil uji *Post-Hoc* LSD pada Tabel 5.7 menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok N8 dengan DM 16 (0,000), kelompok N8 dengan DM+DP8 (0,005), kelompok N16 dengan DM16 (0,014), kelompok N16 dengan DM+DP8 (0,000), kelompok N16 dengan DM+DP16 (0,006), kelompok DM8 dengan kelompok DM16 (0,014), kelompok DM8 dengan DM+DP8 (0,000), dan kelompok DM8 dengan DM+DP16 (0,000).

Tabel 5.8 Hasil Uji *Post-Hoc* Rata-rata Jumlah Sel Busa Setiap Kelompok Serial Waktu 8 dan 16 Minggu dengan Metode Duncan^a

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
DM+DP8	5	4.0000			
DM+DP16	5	6.9000	6.9000		
N8	5		9.2000	9.2000	
N16	5			12.0000	
DM8	5			12.0000	
DM16	5				16.5000
Sig.		.101	.188	.131	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Hasil uji *Post-Hoc* Duncan pada Tabel 5.8 menunjukkan jumlah rata-rata sel busa serial waktu 8 dan 16 minggu memiliki perbedaan pada empat kelompok. Kelompok DM+DP8 tergabung dalam kelompok data 1, DM+DP16 berada pada kelompok data 1 dan 2. Kelompok N8 berada pada kelompok data 2 dan 3. Kelompok N16 dan DM8 tergabung pada kelompok data 3, dan DM16 berada pada kelompok data 4.