

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *true experimental* yang dikerjakan di laboratorium secara *in vivo*, dengan menggunakan metode rancangan *post-test only control group design*, untuk mengetahui pengaruh pemberian peptida polisakarida terhadap tebal tunika intima-media dinding pembuluh darah. Penelitian ini dilakukan dengan cara menguji pengaruh pemberian peptida polisakarida terhadap ukuran ketebalan tunika intima-media aorta tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu dan injeksi streptozotocin.

#### 4.2 Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Pengulangan Sampel

Pengulangan ditentukan melalui rumus : (Solimun, 2001)

$$P (n - 1) \geq 16$$

$$4 (n - 1) \geq 16$$

$$n - 1 \geq 4$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

P : jumlah perlakuan

n: jumlah pengulangan.

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah minimal 5 (lima) kali ditambahkan dua pengulangan menjadi 7 kali, maka pembagian perlakuan kelompok tikus adalah :

Kelompok	Macam Diet Dan Perlakuan	Jumlah Tikus
Kontrol	Diet normal	7
Diabetes Melitus (DM)	Diet tinggi lemak dan Induksi STZ	7
DM + PSP50	Diet tinggi lemak + STZ+ PSP 50	7

	mg/kgBB	
DM + PSP150	Diet tinggi lemak + STZ + PSP 150 mg/kgBB	7
DM + PSP300	Diet tinggi lemak + STZ +PSP 300 mg/kgBB	7

#### 4.2.2 Kriteria Sampel

Kriteria tikus yang dipilih :

1. Tikus berjenis kelamin jantan
2. Usia 6-8 minggu
3. Berat badan  $\pm$  150-200 gram
4. Kondisi sehat dan tidak memiliki kelainan anatomik

#### 4.2.3 Kriteria Drop-Out

1. Tikus mengalami diare selama masa penelitian yang ditandai dengan feses tidak terbentuk dan atau mengalami penurunan berat badan
2. Tikus mati dan sakit selama masa perlakuan
3. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan

#### 4.3 Variabel Penelitian

- a) Variabel independen : pemberian dosis PSP yang diberikan pada tikus yakni 50 mg/kgBB, 150mg/kgBB, dan 300mg/kgBB.
- b) Variabel dependen : tebal tunika intima-media dinding pembuluh darah.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dan pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan slide, pewarnaan

HE dan pengukuran tebal tunika intima-media dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan Juli 2013 hingga Oktober 2013.

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

Hewan coba dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) dipilih galur Wistar karena keberhasilan dalam suatu percobaan pembuatan model Diabetes Melitus Tipe 2 pada tikus (Kustiyah *et al*, 2003). Pembuatan hewan coba model Diabetes Melitus Tipe 2 menggunakan tikus tersebut berumur 6-8 minggu dengan berat badan 150-200 gram dalam kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif. Tikus didapat dari CV Gamma Scientific Biolab Malang. Tikus kelompok kontrol diberi diet normal selama 12 minggu penelitian berjalan. Tikus kelompok DM diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu penelitian berjalan dan induksi STZ pada minggu keempat. Tikus kelompok DM + PSP 50 diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu penelitian, induksi STZ pada minggu keempat dan terapi PSP 50 mg/kgBB pada minggu kesembilan hingga minggu keduabelas. Tikus kelompok DM + PSP 150 diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu penelitian, induksi STZ pada minggu keempat dan terapi PSP 150 mg/kgBB pada minggu kesembilan hingga minggu keduabelas. Tikus kelompok DM + PSP 300 diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu penelitian, induksi STZ pada minggu keempat dan terapi PSP 300 mg/kgBB pada minggu kesembilan hingga minggu keduabelas.

Pemeliharaan hewan coba membutuhkan alat dan bahan berupa kandang 40x30x20 cm beserta perlengkapannya seperti tempat makan dan minum tikus, sekam, dan timbangan berat badan tikus.

Pakan yang digunakan adalah pakan normal dan pakan tinggi lemak. Pembuatan pakan normal membutuhkan alat dan bahan berupa timbangan analitik, baskom, air, PARS 57,3 % dan tepung terigu 33,4 %. Pembuatan pakan tinggi lemak membutuhkan alat dan bahan berupa timbangan analitik, baskom, PARS 57%, tepung terigu 31,8%, kolesterol 1,9%, asam kholat 0,1% dan minyak babi 8,9%.

Alat dan bahan untuk pembedahan dan pengambilan sampel aorta adalah seperangkat alat bedah, stiker, jarum pentul, sterofoam, kapas, eter, formalin 10%, alkohol, botol organ dan alat tulis. Alat untuk mengukur kadar glukosa darah Blood Glucose Test Meter GlucoDr (All Medicus Co.Ltd.Korea).

Pengukuran ketebalan tunika intima-media aorta dilakukan melalui sediaan histopatologi yang diamati menggunakan *scan dot slide OlyVia* dengan pembesaran 40 kali. Diukur menggunakan software tersebut dalam satuan  $\mu\text{m}$  sebanyak 5 kali pengulangan pengukuran pada setiap sampel. Pengukuran dilakukan dengan menarik garis tegak lurus dari tunika intima hingga tunika media dinding pembuluh darah secara langsung.

PSP didapatkan dari PT. Sahabat Lingkungan Hidup, Surabaya. Berupa sediaan *freeze dried* di mana setiap 250 mg PSP mengandung sekitar 80%  $\beta$ -D-glucan atau 200 mg.

#### 4.6 Definisi Operasional

Berikut Definisi Operasional yang digunakan sebagai batasan dalam penelitian ini.

Tabel 4.1 Tabel Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur/Parameter	Hasil Ukur	Skala Ukur
1	Pemberian PSP	Kapsul PsP yang digunakan dalam penelitian diproduksi oleh SLH-Labs, Surabaya, mengandung ekstrak polisakarida <i>Ganoderma lucidum</i> 250mg yang mengandung 200mg $\beta$ -D-Glukan.	Dosis 50mg/kgBB 150mg/kgBB 300mg/kgBB	mg/ kgBB	Nominal (-)
2	Tunika Intima-media	Penebalan lapisan dinding pembuluh darah aorta ke arah lumen yang diketahui dari hasil pengecatan H.E	Teridentifikasi tebal lapisan otot polos vaskular yang diukur dari tunika intima hingga batas tunika media dengan tunika adventisia dari hasil scan	$\mu$ m	Rasio

			software Dot Slide Olyvia menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 40x		
--	--	--	--	--	--

#### 4.7 Prosedur Penelitian

Berikut prosedur penelitian yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini.

##### 4.7.1 Pengurusan Ethical Clearance

Ethical Clearance atau pengurusan etik penelitian dilaksanakan dengan menyusun proposal terlebih dahulu kemudian akan dievaluasi oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

##### 4.7.2 Persiapan Pemeliharaan Hewan Coba

Melakukan persiapan pemeliharaan hewan coba. Dimulai dengan persiapan alat dan bahan penelitian dan dilakukan seleksi tikus berdasarkan usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan. Tikus sebelumnya diaklimatisasi selama 2 minggu dengan diberi pakan normal yang terdiri dari comfeed PARS, tepung terigu, dan air. Diet diberikan sebanyak 40 g/ ekor tikus/ hari dari campuran bahan tersebut dan diberikan setiap hari. 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 aklimatisasi, tikus dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol yang diberi diet normal, kelompok DM yang diberi diet tinggi lemak dan

induksi STZ, kelompok perlakuan yang diberi diet tinggi lemak, induksi STZ dan diberi PSP 50 mg, 150 mg, 300 mg per kg BB.

#### **4.7.3 Pembuatan Diet Normal**

Diet normal merupakan diet yang diberikan untuk kelompok kontrol. Diet normal merupakan asupan normal tikus dan tidak menimbulkan efek aterogenik maupun kondisi Diabetes Melitus dimana kadar glukosa darah acak  $\geq 200$ mg/dL. Diet normal berupa pakan standart yang terdiri dari pakan ayam / PARS dengan kandungan air, protein, lemak, serat, abu, Ca, Phospor, antibiotika, coccidiostat 66.6% dan tepung terigu 33.4%. Komposisi bahan terdiri atas PARS 25,6 gram, tepung terigu 14 gram, dan air 0,4 gram (Mutiyani, 2005). Semua bahan dicampur dalam baskom. Setelah itu, ditimbang dan dibulatkan dengan berat 40 gram untuk satu tikus. Makanan diberikan 40 gram/tikus tiap harinya.

#### **4.7.4 Pembuatan Diet Tinggi Lemak**

Pemakaian kolesterol, minyak babi dan asam kolat bertujuan untuk menginduksi peningkatan LDL darah. Minyak babi mempunyai kandungan kolestrol yang lebih tinggi dibandingkan dengan minyak hewani lainnya dan minyak nabati. Diet tinggi lemak berupa pakan standart (pakan ayam/ ParS 57.3% dan tepung terigu 31.8%) ditambah kolesterol 1.9%, asam kolat 0,1% dan minyak babi 8.9% (Mawarti & Ratnawati, 2012).

#### **4.7.5 Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2**

Setelah aklimatisasi, selama 4 minggu tikus diberi diet tinggi lemak. Kemudian diinduksi dengan Streptozotocin (STZ) intraperitoneal. Dilanjutkan kembali 8 minggu dengan diet tinggi lemak. Berikut detail perlakuan tiap kelompok :

1. Tikus kelompok kontrol diberi diet normal selama 12 minggu
2. Tikus kelompok DM diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu penelitian berjalan dan induksi STZ peritoneal sesuai berat badan tikus pada minggu keempat.
3. Tikus kelompok DM + PSP 50 diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu penelitian, induksi STZ peritoneal sesuai berat badan tikus pada minggu keempat dan terapi PSP 50 mg/kgBB pada minggu kesembilan hingga minggu keduabelas.
4. Tikus kelompok DM + PSP 150 diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu penelitian, induksi STZ peritoneal sesuai berat badan tikus pada minggu keempat dan terapi PSP 150 mg/kgBB pada minggu kesembilan hingga minggu keduabelas.
5. Tikus kelompok DM + PSP 300 diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu penelitian, induksi STZ peritoneal sesuai berat badan tikus pada minggu keempat dan terapi PSP 300 mg/kgBB pada minggu kesembilan hingga minggu keduabelas.

Pengecekan glukosa darah dilakukan sebelum dan sesudah induksi STZ. Apabila kadar glukosa  $<200$  maka dilakukan induksi STZ yang kedua dalam selang waktu 2 minggu. Pengukuran sisa pakan dilakukan setiap hari, sedangkan pengukuran berat badan dilakukan 2 minggu sekali.

#### 4.7.6 Prosedur Pembuatan dan Pemberian PSP

Proses Pembuatan Peptida polisakarida dibagi dalam 2 tahapan yaitu :

Proses up stream dan Proses down stream.

- Proses up stream : Pertama dilakukan pemilihan badan buah jamur *Ganoderma lucidum* lalu diinokulasi pada media Potato Dextrose Agar

(PDA) hingga di dapatkan pertumbuhan miselia pada media PDA tersebut, kemudian miselia diinokulasi pada media cair dengan suhu inkubasi antara 24-26 °C, selama 40-50 hari di tempat gelap.

- Proses down stream : Pada proses down stream dimulai dengan pemanenan miselia *Ganoderma lucidum* serta homogenisasi kemudian dilanjutkan dengan ekstraksi dan sentrifugasi yang selanjutnya dilakukan presipitasi (pengendapan) dan evaporasi serta liofilisasi sehingga didapatkan ekstrak padat kering dan kemudian diukur kadar  $\beta$ -1,3/1,6-D-Glukannya.

Cara melarutkan ekstrak polisakarida :

1. Ekstrak dalam tiap vial dilarutkan dalam 100 ml aquadest panas  $\pm 70 - 80^{\circ}\text{C}$ .
2. Diaduk dalam *beaker glass* menggunakan *magnetic stirrer* selama  $\pm 1$  jam dengan suhu  $\pm 70 - 80^{\circ}\text{C}$ .
3. Larutan kemudian disaring menggunakan kertas saring.
4. Larutan dapat disimpan dalam *chiller* bersuhu  $2-4^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 1$  minggu.

Setelah 8 minggu tikus diberi pakan tinggi lemak dan induksi STZ. Selama 4 minggu tikus diberi PSP sesuai dosis yang telah ditentukan dalam pembagian perlakuan kelompok. PSP diberikan setiap harinya menggunakan sonde.

#### 4.7.7 Pembedahan dan Pembuatan Preparat

Pembedahan dilakukan ada hari ke-90, diawali dengan anestesi erinhalasi menggunakan kloroform dalam wadah tertutup. Tikus yang telah dianestesi diletakan di atas sterofoam, fiksasi dengan jarum pentul dan bedah tikus mulai dari area perut. Sampel yang diambil adalah potongan arcus aorta

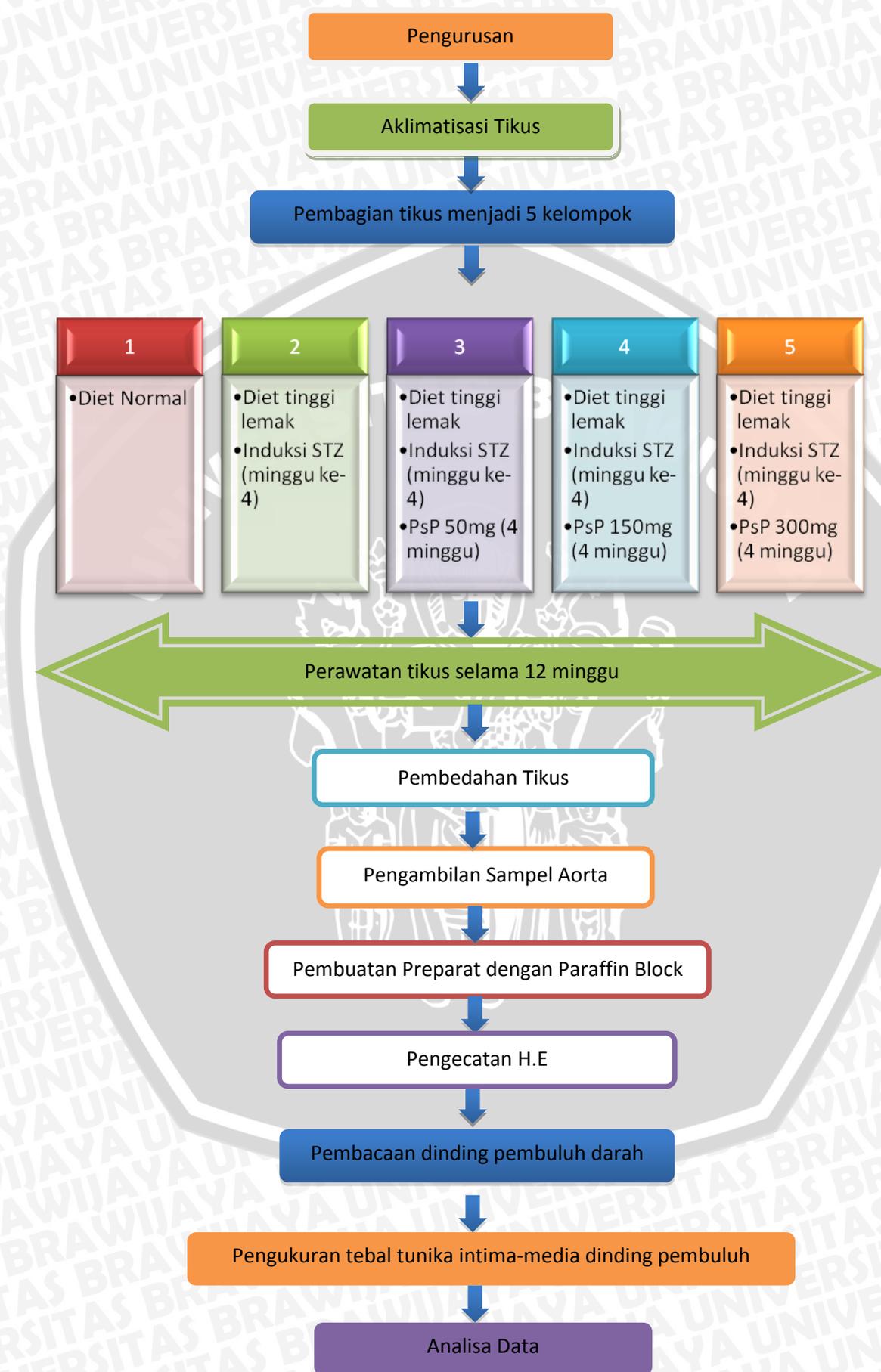
tikus. Potongan aorta disimpan dalam formalin 10% untuk diawetkan sebelum pembuatan slide.

#### 4.7.8 Pembuatan Slide Preparat Histopatologi dan Pengukuran Tunika Intima-Media

Prosedur diawali dengan pemilihan jaringan yang terbaik. Potong jaringan kurang lebih dengan ketebalan 2-3 mm. Masukkan jaringan ke dalam kaset sesuai kode. Fiksasi dalam formalin 10%. Proses jaringan menggunakan *tissue tex processor*. Pembuatan preparat menggunakan metode *paraffin block*. Angkat jaringan dari *tissue tex processor* kemudian blok jaringan dengan parafin sesuai kode jaringan. Potong jaringan menggunakan *microtome* dengan ketebalan 3-5 mikron. Mulai proses deparafinisasi dengan meletakkan jaringan dalam oven selama 1-2 jam dengan suhu 60°C, kemudian dimasukkan dalam larutan xylol, masing-masing 15 menit. Celupkan dalam alkohol 96% selama 3 menit. Bilas dalam air mengalir selama 10 menit. Selanjutnya dilanjutkan dengan proses pengecatan preparat dengan Hematoxylin-Eosin Staining (Yanuartono, 2007). Proses pewarnaan diawali dengan pengecatan tes Harris Hematoksilin selama 10-15 menit dilanjutkan dengan pembilasan menggunakan air mengalir selama 15 menit. Masukkan dalam alkohol asam 1% sebanyak 2-5 celup, lalu ke celupkan dalam amoniak air 3-5 celup. Teteskan cat pembanding yakni eosin 1% selama 15 menit. Proses dehidrasi dengan cara meletakkan preparat dalam alkohol 80% selama 3 menit, alkohol 96% selama 3 menit dan alkohol 96% selama 3 menit. Dilakukan penjernihan menggunakan larutan xylol selama 15 menit sebanyak 2 kali. Mounting dengan entelan dan deck glass. Pembacaan slide preparat menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 40x.

Pengukuran tebal tunika intima-media dinding pembuluh darah menggunakan software *Scan Dot Slide Olyvia* dengan satuan ukur  $\mu\text{m}$ .





#### 4.7.8 Analisa Data

Hasil pengukuran tebal tunika intima-media aorta dari semua perlakuan dianalisa secara statistik menggunakan *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS) for Windows* versi 17.0 dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). Langkah – langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut :

- a. Uji Normalitas Data : bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran 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. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik. Uji normalitas yang digunakan pada penelitian ini adalah Uji normalitas Shapiro wilk karena jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini kurang dari 50 ( $n \leq 50$ ), dimana suatu data dikatakan memiliki sebaran normal jika  $p > 0,05$ .
- b. Uji Homogenitas Levene : bertujuan 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 uji homogenitas levene suatu data dikatakan memiliki varian yang homogeny bila nilai signifikansi  $p > 0,05$ .

- c. Uji *One-way ANOVA* : bertujuan untuk membandingkan nilai 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 secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah Uji LSD dengan tingkat signifikasi 95 % ( $p < 0,05$ ).
- e. Uji Korelasi *Pearson* : bertujuan untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala interval (parametrik).

