BAB IV

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

4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan adalah tikus 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 (5)

r = jumlah dari sampel penelitian

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

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

$4r - 4 \geq 15$

$r \geq 4,75 \approx 5$

Jumlah minimal tikus yang digunakan dalam tiap kelompok adalah 5 sesuai dengan rumus Federrer.

Lima kelompok perlakuan yang ada adalah sebagai berikut (masing-masing 5 ekor tikus):

2. Kelompok kontrol positif dengan pemberian *High Fat Diet* (HFD) tanpa pemberian Peptida Polisakarida (PsP)
3. Kelompok perlakuan dengan rincian sebagai berikut:
    1. Kelompok dengan pemberian PsP 50 mg/kgBB
    2. Kelompok dengan pemberian PsP 150 mg/kgBB
    3. Kelompok dengan pemberian PsP 300 mg/kgBB

Sehingga total minimum dari seluruh sampel yang digunakan adalah 25 ekor tikus *Rattus norvegicus Wistar Race* dengan masing-masing tikus berusia 6-8 minggu dan memiliki berat 150-200 gram.

4.3 Variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dibedakan menjadi:

1. Variabel bebas: pemberian Peptida Polisakarida (PsP)
2. Variabel terikat: jumlah sel busa (*foam cell*) setelah diberikan PsP.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian ini adalah Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Biosains FKUB. Waktu dimulainya penelitian adalah 28 Juni 2013, yang mana adalah waktu kedatangan tikus di laboratorium dan juga dimulainya masa aklimatisasi tikus. Penelitian diakhiri pada 28 November 2013 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 untuk tikus subjek penelitian (kandang standard dan kandang metabolik).
2. Neraca elektronik untuk menimbang sisa pakan tikus.
3. Alat tes glukosa (*glucotest*) lengkap untuk mengetahui kadar glukosa darah tikus (*glucometer, test strip*)
4. Spuit 10 cc untuk injeksi Streptozotocin dan pengambilan sampel darah tikus.
5. Sonde untuk pemberian peptide polisakarida (PsP) pada tikus.
6. Pengaduk magnetic (*magnetic stirrer*) untuk melarutkan PsP dengan akuades.
7. Peralatan pembedahan (papan bedah, jarum pentul, gunting, botol organ).
8. Peralatan untuk fiksasi jaringan dengan *frozen section*.
9. Mikroskop dengan perbesaran 400 kali untuk pengamatan sediaan aorta.
10. Komputer dengan software *dostlide Olyvia* untuk melakukan penghitungan sel busa dari aorta tikus.

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%) (proses pembuatan terlampir).
3. Diet atherogenik (*High Fat Diet*) (ParS 57.3% dan tepung terigu 31.8%) ditambah kolesterol 1.9%, asam kolat 0,1% dan minyak babi

8.9%) (proses pembuatan terlampir).

4. Streptozotocin yang diberikan sebesar 30 mg/kgBB pada masing-masing tikus.
5. Peptida polisakarida (PsP) dari jamur *Ganoderma lucidum* dengan komposisi ekstrak *Ganoderma lucidum* 250 mg yang setiap gramnya mengandung 200 mg (PsP) β-D-glucan (proses ekstraksi terlampir).
6. Bahan anestesi untuk pembedahan.
7. Formalin untuk pengawetan sediaan aorta.
8. Pewarnaan Hematoksilin Eosin.
9. Kaca benda untuk fiksasi sediaan aorta.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian tersebut dapat dijelaskan dengan tabel di bawah ini:

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur (Parameter)	Hasil Ukur	Skala Ukur
Pemberian PsP dari jamur *Ganoderma lucidum*	Pemberian kapsul PsP yang mengandung ekstrak *Ganoderma lucidum* 250 mg dengan berat setiap gram mengandung 200 mg β-D-glucan produksi mitra SLH-Labs, Surabaya.	Dosis 50 mg/kgBB, 150 mg/kgBB, dan 300 mg/kgBB selama 4 minggu dan setelah diberikan injeksi STZ sesuai berat badan tikus.	mg/KgBB	-
Sel Busa (Foam Cell)	Hasil perhitungan sel yang teridentifikasi dengan menggunakan mikroskop	Mikroskop dengan perbesaran 40 x dan software dotSlide Olyvia	Sel	rasio

	perbesaran 40x dan software dotSlide, Olyvia dengan ciri-ciri: sel pucat, berinti yang terdapat pada endotel aorta tikus.	untuk melihat sel tersebut.		

4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini diawali dengan pengurusan etik (*ethical clearance*) yang meliputi proposal, formulir layak etik, dan penjelasan etik penelitian. Penelitian mengenai pengaruh PsP *Ganoderma lucidum* terhadap DM Tipe 2 mendapatkan izin dari Komisi Etik FKUB dengan nomor 462/EC/KEPK/08/2013. Kemudidan dilanjutkan dengan masa aklimatisasi pada 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 24 jam yang kemudian diganti pada hari berikutnya. Pakan memiliki berat masing-masing 30 gram. 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, kontrol positif, DM-50, DM-150, dan DM-300 seperti yang telah disebutkan sebelumnya. Pakan yang diberikan pada tikus kelompok perlakuan adalah pakan *High Fat* Diet (HFD) atau diet atherogenik yang dibuat dengan komposisi pakan ayam/ ParS 57.3% dan

tepung terigu 31.8%) ditambah kolesterol 1.9%,asam kolat 0,1% dan minyak babi 8.9%. Pakan *High Fat Diet* (HFD) diberikan setiap hari berselang 24 jam dengan berat masing-masing pakan 40 gram. HFD diberikan selama 4 minggu, kemudian tikus diinduksi dengan Streptozotocin (STZ) 30 mg/kgBB agar tikus dapat dikategorikan sebagai DM tipe 2. Tes glukosa darah juga dilakukan pada tikus setelah penginjeksian STZ untuk mengetahui kadar gula darah acak (GDA) tikus sudah masuk dalam kriteria DM tipe 2 ataukah belum.

HFD dilanjutkan hingga 4 minggu kemudian dan sesudahnya diberikan Peptida Polisakarida (PsP) bersamaan dengan HFD selama 4 minggu terakhir dan diakhiri dengan pembedahan. HFD diberikan dengan total waktu pemberian adalah 12 minggu untuk memastikan terjadinya disfungsi endotel yang dapat diobservasi dengan sediaan histopatologi pada tikus model DM Tipe 2. PsP diberikan dengan dosis yang telah ditentukan pada masing-masing kelompok perlakuan (50 mg.kgBB, 150 mg.kgBB, dan 300 mg/kgBB). Penentuan dosis PsP *Ganoderma lucidum* sebesar 50, 150, dan 300 mg/kgBB dilakukan berdasarkan penelitian Li, Zhang, dan Zhong (2011) dan Seto, *et al.* (2009) mengenai efek pemberian PsP *Ganoderma lucidum* terhadap tikus model diabetes. 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 2 mL.
2. PsP per kelompok perlakuan diberikan dengan perhitungan sebagai berikut (berat setiap tikus kurang lebih 200 gram/0,2 kg):

1. Pada tikus dosis PsP 50 mg : 50 mg/kgBB x 0,2 kg = 10 mg
2. Pada tikus dosis PsP 150 mg : 150 mg/kgBB x 0,2 kg = 30 mg
3. Pada tikus dosis PsP 300 mg : 300 mg/kgBB x 0,2 kg = 60 mg

3. Kebutuhan PsP selama satu minggu untuk setiap kelompok perlakuan:

1. Tikus dosis PsP 50 mg/kgBB:

Polisakarida : 10 mg x 7 tikus x 7 hari = 490 mg.

Air : 2 ml x 7 tikus x 7 hari = 98 mL.

Keperluan untuk satu minggu dengan 100 mL air: 100 ml/98 ml x 490 mg = 500 mg.

2. Tikus dosis PsP 150 mg/kgBB:

Polisakarida : 30 mg x 7 tikus x 7 hari = 1470 mg.

Air : 2 ml x 7 tikus x 7 hari = 98 ml.

Keperluan untuk satu minggu dengan 100 mL air: 100 ml/98 ml x 1470 mg = 1500 mg

3. Tikus dosis PsP 300 mg/kgBB:

Polisakarida : 60 mg x 7 tikus x 7 hari = 2940 mg.

Air : 2 ml x 7 tikus x 7 hari = 98 ml.

Keperluan untuk satu minggu dengan 100 mL air: 100 ml/98 ml x 2940 mg = 3000 mg

4. Ekstrak dilarutkan dalam 100 mL aquades panas bersuhu kurang lebih 70-80º C.
5. Ekstrak diaduk dengan pengaduk magnetik (*magnetic stirrer*) selama kurang lebih satu jam dengan suhu 70-80º C.
6. Larutan PsP yang telah selesai diaduk disaring menggunakan kertas

saring dan disimpan dalam lemari pendingin bersuhu kurang lebih 2-4º C.

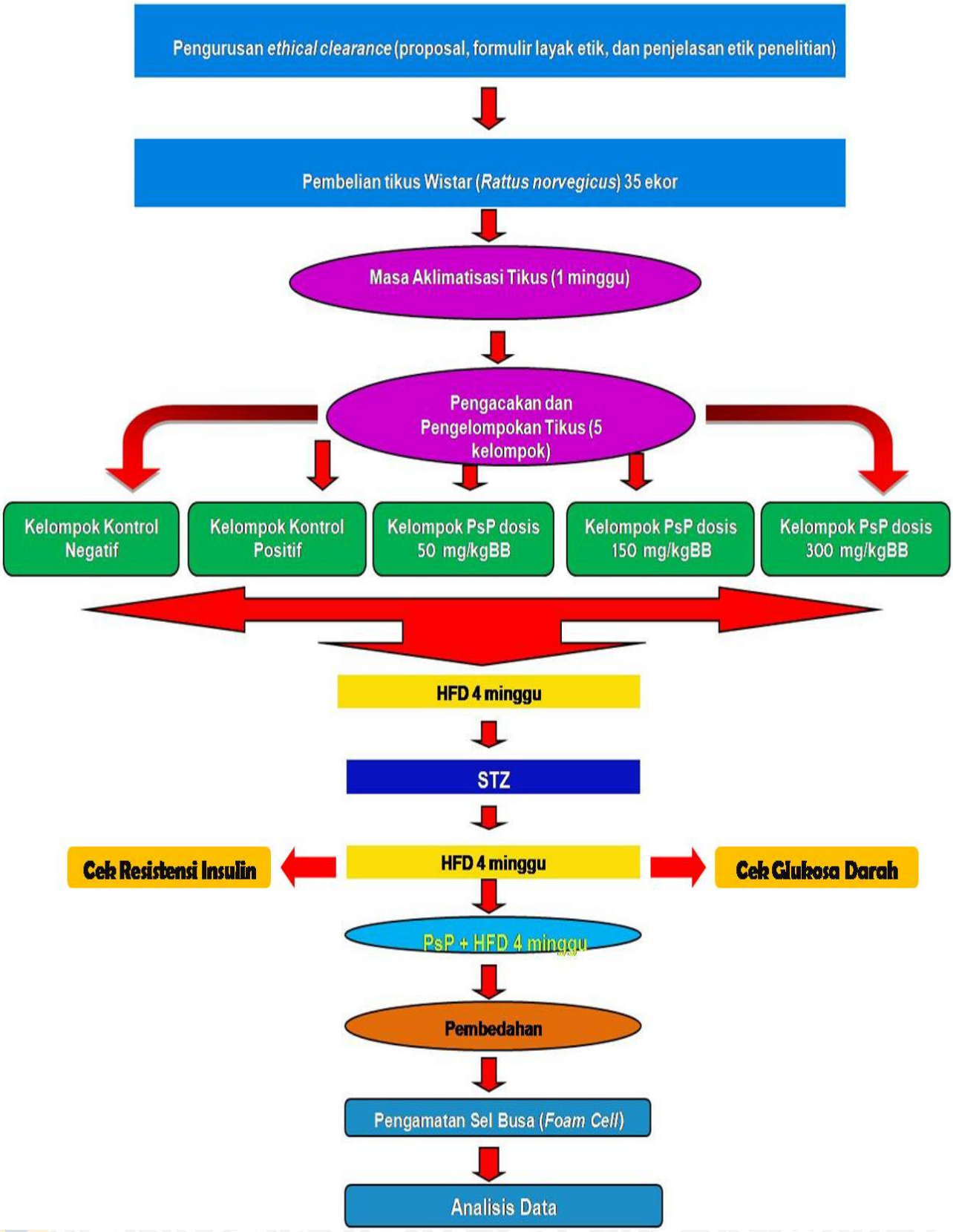
4.9 Pengukuran

Pengukuran jumlah sel busa (*foam cell*) dilakukan setelah pembedahan tikus dengan jaringan yang akan diamati sel busanya adalah aorta. Fiksasi pada jaringan dilakukan dengan metode parafin blok yang kemudian diletakkan pada kaca benda (*slide)* untuk diamati sel busanya. Kemudian sediaan aorta yang digunakan untuk mengamati sel busa diberi pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE *Staining*) agar sel busa dapat diamati. Setelah itu, pembacaan sel busa dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400 x dan software *dotSlide Olyvia* dengan lapangan pandang 10 kali untuk setiap sediaan aorta.

4.10 Analisis 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 Saphiro-Wilk 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 sel busa 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 Post Hoc dengan metode Tukey HSD untuk mengidentifikasi kelompok yang berbeda tersebut. Untuk mengetahui kekuatan korelasi antara perlakuan

(pemberian PsP *Ganoderma lucidum*) terhadap jumlah sel busa (*foam cell*) antar kelompok perlakuan, dilakukan uji korelasi Pearson setelah melakukan uji Post Hoc dengan metode Tukey HSD.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4.11 Alur Penelitian