

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan *randomize, post test, control group*, dan *true experimental* untuk mengetahui pengaruh pemberian PsP pada intima-media aterosklerosis. Penelitian ini dilakukan dengan cara menguji pengaruh pemberian PsP pada ketebalan intima-media aorta tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberikan diet tinggi lemak selama 8 minggu.

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Sampel Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan. Banyak pengulangan ditentukan oleh rumus Federrer (Wardhani, 2006) yaitu :

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

t : jumlah perlakuan, pada penelitian ini t=5

r : jumlah sampel penelitian

Sehingga jumlah pengulangan yang dilakukan adalah:

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$r = \pm 5$$

Jadi banyaknya pengulangan minimal 5 kali untuk setiap perlakuan dengan jumlah mencit yang digunakan pada penelitian ini sejumlah 5x5 kelompok =25 ekor hewan model.

Tabel 4.1 Tabel Kelompok Perlakuan

KELOMPOK	MACAM DIET DAN PERLAKUAN	JUMLAH TIKUS
Kontrol Negatif (K-)	Diet normal	5
Kontrol Positif (K+)	Diet Tinggi Lemak	5
PsP Dosis 50 mg/kgBB	Diet Tinggi Lemak + PsP 50 mg/kgBB	5
PsP Dosis 150 mg/kgBB	Diet Tinggi Lemak + PsP 150 mg/kgBB	5
PsP Dosis 300 mg/kgBB	Diet Tinggi Lemak + PsP 300 mg/kgBB	5

4.2.2 Kriteria Sampel

Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Tikus berjenis kelamin jantan
- Umur 2-3 bulan
- Berat badan sekitar 150-200 gram
- Kondisi sehat dan tidak ada kelainan anatomi
- Tikus tidak mengalami diare selama masa penelitian yang ditandai dengan feses tidak terbentuk dan atau mengalami penurunan berat badan
- Tikus tidak mati dan sakit selama masa perlakuan
- Tikus mau makan diet yang diberikan selama masa perlakuan

4.2.3 Kriteria Drop Out

Tikus dinyatakan *drop out* apabila tidak sesuai dengan kriteria, sehingga didapat jumlah tikus sesuai ketentuan sampel.

4.3 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas pada penelitian ini adalah PsP
- b. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah intima media aorta

4.4 Lokasi dan waktu penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli sampai Agustus 2013.

4.5 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk pemeliharaan hewan coba adalah kandang berukuran 40x30x20 cm beserta perlengkapannya seperti tempat makan dan minum tikus. Hewan coba dalam penelitian ini adalah tikus putih (*rattus norvegicus*) galur wistar berumur 4 minggu dengan berat badan kurang lebih 150-200 gram dalam kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif. Tikus didapat dari CV Gamma Scientific Biolab Malang. Pakan yang digunakan adalah pakan normal yang biasa dipergunakan di laboratorium farmakologi Fakultas kedokteran. Alat dan bahan untuk analisis ketebalan intima media aorta tikus adalah alat pembedahan tikus, paraffin blok, formalin, stiker, dan *dot slide microscop* dan alat tulis. PSP didapatkan dari PT. Sahabat Lingkungan Hidup, Surabaya. Berupa sediaan *freeze dried* di mana setiap 250 mg PSP mengandung sekitar 80% β -D-glucan atau 200 mg.

4.6 Definisi operasional

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

Tabel 4.2 Tabel Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Hasil Ukur	Skala Ukur
PsP (Polysaccharide peptide)	Kapsul PsP yang digunakan dalam penelitian diproduksi oleh SLH-Labs, Surabaya, mengandung ekstrak polisakarida <i>Ganoderma lucidum</i> 250mg yang mengandung 200mg β -D-Glukan.	Dosis 50, 150, dan 300 diberikan selama 4 minggu	mg/Kg BB	(-)
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 di	Teridentifikasinya lapisan dinding aorta bagian tunika intima, media yang menebal	μ m	Ratio

ukur ketebalannya			
menggunakan software			
OlyVIA			

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pengurusan Etik

Pengurusan etik penelitian dilaksanakan dengan menyusun proposal terlebih dahulu, kemudian akan dievaluasi oleh komisi etik penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7.2 Aklimatisasi 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 diaklimasi 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.

4.7.3 Pemberian Diet Normal dan Diet Tinggi Lemak

Tikus dengan kontrol negatif sejumlah 5 ekor diberikan diet normal yang terdiri dari pakan ayam/PARS (dengan kandungan akhir, protein, lemak, serat, abu, Ca, Phospor, antibiotika, dan coccidiostat) 66,6% dan tepung terigu 33,4%. Sedangkan tikus lainnya diberikan diet tinggi lemak berupa campuran pakan standart yang terdiri dari pakan ayam/ParS 57.3% dan tepung terigu 31.8% ditambah dengan kolesterol 1.9%, asam kolat 0.1%, dan minyak babi 8.9%.

Pemberian diet pada masing-masing tikus diatas diberikan dalam waktu yang sama, yaitu selama 12 minggu.

4.7.4 Pembagian Tikus, Pembuatan dan Pemberian PsP

Tikus dibagi menjadi 5 kelompok. Dua kelompok pertama yaitu kontrol negatif yang diberikan diet normal dan kontrol positif yang diberikan diet tinggi lemak selama 12minggu. Sedangkan 3 kelompok lainnya diberi diet tinggi lemak saja selama 8 minggu kemudian ditambahkan pemberian PsP (*Polysaccharide Peptide*) selama 4 minggu dengan tetap memberikan diet tinggi lemak.

Proses Pembuatan Peptida polisakarida dibagi dalam 2 tahapan yaitu:

a. Proses up 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.

b. Proses down stream.

- 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 β -1,3/1,6-D-Glukannya.

Cara melarutkan ekstrak polisakarida :

- Ekstrak dalam tiap vial dilarutkan dalam 100 ml aquadest panas $\pm 70 - 80^{\circ}\text{C}$.
- Diaduk dalam *beaker glass* menggunakan *magnetic stirer* selama ± 1 jam dengan suhu $\pm 70 - 80^{\circ}\text{C}$.

- Larutan kemudian disaring menggunakan kertas saring.
- Larutan dapat disimpan dalam *chiller* bersuhu 2-4°C selama ± 1 minggu.
- Larutan diberikan pada tikus dengan menggunakan sonde

4.7.5 Pembedahan

Tikus di euthanasia dengan menggunakan eter, kemudian di bedah dan diambil bagian aortanya. Setelah itu, aorta tersebut dimasukkan ke dalam formalin 10% untuk diawetkan sebelum pembuatan slide.

4.7.6 Pembuatan Slide

Pembuatan Slide dimulai dari memilih jaringan yang terbaik lalu di potong $\pm 2-3$ mm dan dimasukkan kedalam kaset yang dimasukkan ke dalam formalin 10% untuk di fiksasi kemudian di proses menggunakan alat/mesin tissue prosesor. Tahap selanjutnya adalah pengeblokan dan pemotongan jaringan, yaitu dengan memblok jaringan yang telah diangkat dari mesin tissue tex, kemudian jaringan tersebut dipotong dengan mesin microtome ($\pm 3-5$ mikron). Setelah dipotong, dilakukan deparafinasi dengan memasukkan dalam oven selama 1-2 jam dengan suhu 60°C, kemudian dimasukkan ke dalam larutan xylol, masing-masing 15 menit. Setelah itu di celupkan ke masing-masing tabung alcohol 96% selama 3 menit dan masukkan / cuci ke dalam air mengalir selama 10 menit. Tahap akhir dalam prosedur ini adalah dengan pewarnaan HE, yaitu dengan memberi jaringan cat utama Harris Hematosiklin selama 10-15 menit, lalu cuci dengan air mengalir selama 15 menit. Preparat tersebut dimasukkan ke dalam alcohol asam 1%, amoniak air, kemudian dimasukkan ke dalam cat pembeding yaitu Eosin 1% selama 15 menit. Proses dehidrasi yang selanjutnya dilakukan, dimulai dengan dimasukkannya preparat ke dalam alcohol 80% selama 3 menit, alcohol 96% selama 3 menit, dan alcohol 96% selama 3 menit. Penjernihan preparat

tersebut dengan larutan xylol selama 15 menit sebanyak 2 kali, lalu mounting dengan entelan dan deck glass.

4.7.7 Pengukuran Tebal Intima Media

Pengukuran ketebalan intima media aorta dalam penelitian ini menggunakan *Dot Slide Microscope*. Hasil gambar yang diperoleh di baca dengan *software OlyVIA* dengan perbesaran 400x. Tebal dinding dapat diukur dengan menarik garis tegak lurus garis terdalam tunika intima dan garis terluar tunika media. Pengukuran dilakukan pada bagian aorta secara acak dalam lima kali pengukuran, kemudian diambil nilai rata-ratanya.

4.8 Pengolahan Data

Analisa data yang digunakan adalah statistik parametrik, yaitu menggunakan *One Way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) setelah memenuhi uji normalitas *Shapiro-Wilk* data dan uji homogenitas *Levene*. Apabila data signifikan ($p < 0,05$), akan dilakukan uji *Post Hoc LSD* untuk mengidentifikasi perbedaan antar kelompok. Kemudian menilai korelasi *Pearson* antar variabel ketebalan intima media aorta dengan pemberian dosis PsP. Analisis data menggunakan program *Software Statistical Product dan Service Solution (SPSS) for Windows versi 16.0*.

4.9 Alur Penelitian

