

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental laboratory* secara in vivo, menggunakan pendekatan *post-test only control group design* untuk mengetahui pengaruh pemberian peptida polisakarida *Ganoderma lucidum* pada ketebalan PVAT. Penelitian ini dilakukan dengan cara menguji pengaruh dari pemberian peptida polisakarida *Ganoderma lucidum* terhadap ketebalan PVAT pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberikan HFD dan induksi STZ.

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Sampel Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan. Banyak pengulangan ditentukan oleh rumus Federrer 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.

Untuk penelitian ditambah dua kali pengulangan, menjadi 7 kali, jadi jumlah tikus yang digunakan pada penelitian ini sejumlah 7x5 kelompok= 35 ekor hewan model.

4.2.2 Kriteria Sampel

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus berjenis kelamin jantan
- b. Umur 2-3 bulan
- c. Berat badan sekitar 100-200 gram
- d. Kondisi sehat dan tidak ada kelainan anatomik

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus mengalami diare selama masa penelitian yang ditandai dengan feses tidak terbentuk dan atau mengalami penurunan berat badan
- b. Tikus mati dan sakit selama masa perlakuan
- c. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan

4.3 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas pada penelitian ini adalah PsP
- b. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ketebalan PVAT.

4.4 Lokasi dan waktu penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Biosains (LSIH) Universitas Brawijaya dan pengukuran ketebalan PVAT dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli sampai November 2013.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba

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 *rattus norvegicus* berumur 4 minggu dengan berat badan 100-200 gram dalam kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif. Tikus didapat dari CV Gamma Scientific Biolab Malang.

4.5.2 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Diet Normal

Pakan yang digunakan adalah pakan normal yang biasa dipergunakan di laboratorium farmakologi Fakultas kedokteran. Alat dan bahan yang digunakan adalah timbangan analitik, baskom, PARS 66.6%, dan tepung terigu 33.4%.

4.5.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Diet Tinggi Lemak

Alat dan bahan yang digunakan adalah timbangan analitik, baskom, PARS 57.3% dan tepung terigu 31.8% ditambah kolesterol 1.9%, asam kolat 0,1% dan minyak babi 8.9%.

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Tikus

Alat dan bahan yang digunakan adalah gunting bedah, pinset, jarum pentul, kapas, eter, formalin 10%, alkohol, dan botol organ.

4.5.5 Alat dan Bahan membuat Preparat PVAT pada aorta Tikus

Alat dan bahan yang digunakan untuk membuat slide preparat: inkubator, *object glass*, *cover glass*, mikrotom, pinset, dan *Automatic Tissue Processing*, formalin 10%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol absolut, xylol, paraffin, alkohol 70%, dan *Hematoksin-Eosin*. metode blok parafin dan diberi pulasan *Hematoksin-Eosin* (HE). Slide dibuat dengan *Automatic Tissue Processing*.

4.5.6 Alat dan Bahan untuk Pengukuran Ketebalan PVAT

Penampang jaringan dilihat dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Alat dan bahan yang digunakan adalah preparat aorta, mikroskop, dan komputer dengan *software* dotslide.

4.5.7 Alat dan Bahan untuk pembuatan PsP

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

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 dari miselia <i>Ganoderma lucidum</i> 250mg yang mengandung 200mg β -D-Glukan.	Dosis 50, 150, dan 300 diberikan selama 4 minggu	mg/kg BB	(-)
PVAT (Perivascular adipose)	adalah lembaran tipis jaringan adiposa yang terdiri dari sel lemak dan sel stroma yang berada pada	Teridentifikasi kasinya ketebalan PVAT di	μ m	Ratio

<p><i>tissue</i>)</p>	<p>perifer vaskular atau berbatasan dengan tunika intima. Pengukuran ketebalan PVAT menggunakan <i>software dot slide</i> yang berada di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.</p>	<p>sekitar aorta.</p>		
-----------------------	---	---------------------------	--	--

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Membuat Surat Kelaikan Etik

Pengurusan etik penelitian dilaksanakan dengan mengajukan 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 diaklimasi atau di adaptasikan selama 1 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 Pembagian Kelompok Perlakuan

Setelah aklimasi, tikus dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif yang diberi diet normal, kelompok kontrol positif yang diberi diet tinggi lemak+STZ, 3 kelompok perlakuan yang diberi diet tinggi lemak+STZ dan diberi PsP masing-masing kelompok 50 mg/kg BB, 150 mg/kg BB, 300 mg/kgBB. Dosis ini ditentukan berdasarkan penelitian tentang evaluasi aktifitas antioksidan dari polisakarida *Ganoderma lucidum*.

4.7.4 Pembuatan Bahan Diet yang Diberikan pada Tikus

Diet normal yang digunakan berupa pakan standart yang terdiri dari pakan ayam/ParS dengan kandungan air, protein, lemak, serat, abu, Ca, Phospor, antibiotika, dan coccidistat 66.6%, dan tepung terigu 33.4%. Diet normal diberikan selama 1 minggu pertama sebagai tahap adaptasi tikus kontrol positif dan tikus pada 3 kelompok perlakuan namun untuk tikus kontrol negatif sampai dengan 12 minggu.

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%. Diet tinggi lemak diberikan untuk tikus kontrol positif dan tikus pada 3 kelompok perlakuan selama 12 minggu setelah adaptasi selama 1 minggu.

4.7.5 Pembuatan Tikus Model Diabetes Mellitus Tipe 2

Kelompok tikus kontrol positif Diabetes Mellitus (DM) tipe 2 dan kelompok yang diberi perlakuan PsP 50mg/kgBB, 150mg/kgBB, 300mg/kgBB diberi diet tinggi lemak atau *High Fat Diet* (HFD) 40 gram/tikus/hari selama 4 minggu pertama. Selanjutnya pada minggu ke-4 tikus diinduksi dengan *Streptozotocin* (STZ) dosis rendah (30mg/kgBB) secara intraperitoneal sebanyak 1 kali injeksi. Setelah induksi STZ ditunggu selama 1 minggu, kemudian dilakukan pengukuran kadar glukosa darah.

Kemudian dilanjutkan kembali 8 minggu dengan diet tinggi lemak dengan pembagian berdasarkan kelompok yang telah ditentukan sebagai berikut : untuk kelompok tikus kontrol positif Diabetes Mellitus (DM) tipe 2 diberi pakan HFD Selama 8 minggu sedangkan untuk kelompok yang diberi perlakuan PsP 50mg/kgBB, 150mg/kgBB, 300mg/kgBB pada 4 minggu terakhir diberi HFD dan PsP sesuai dosis yang telah ditentukan.

4.7.6 Prosedur Pemberian PSP

Setelah 8 minggu tikus diberi pakan tinggi lemak dan induksi STZ. Selama 4 minggu terakhir tikus diberi PsP sesuai dosis yang telah ditentukan yaitu 50mg/kgBB, 150mg/kgBB, 300mg/kgBB. PsP diberikan setiap harinya menggunakan sonde.

4.7.7 Pembedahan Tikus

Setelah 12 minggu perlakuan, tikus dieuthanasia menggunakan eter. Setelah tikus mati, dilakukan pembedahan tikus untuk mengambil aorta yang kemudian diawetkan dengan menggunakan formalin 10% dalam botol organ.

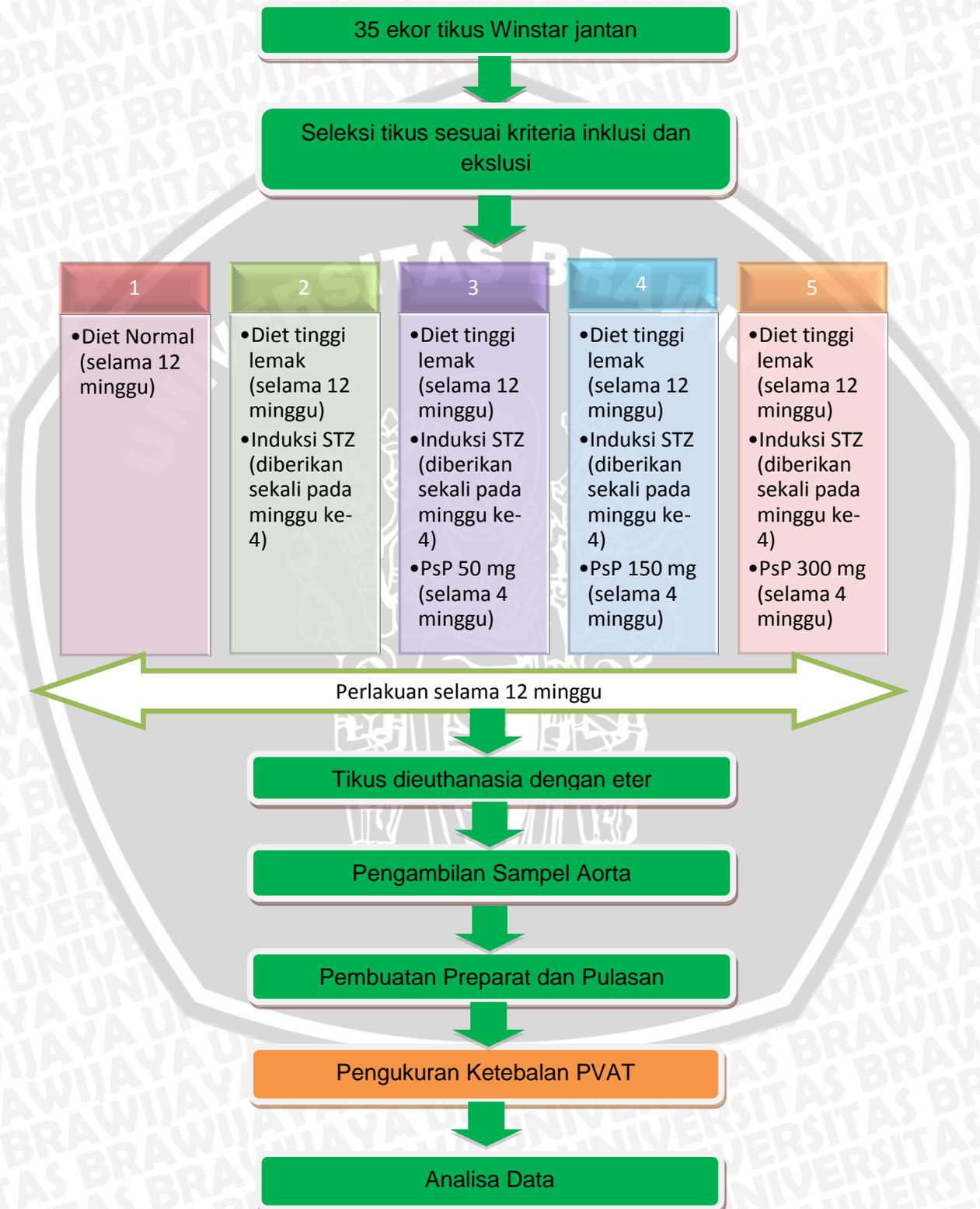
4.7.8 Pembuatan Preparat Aorta

Sampel yang diambil adalah potongan arcus aorta tikus. Aorta yang telah diambil dari tikus kemudian dipotong dengan ketebalan \pm 2-3 mm dan kemudian dimasukkan ke dalam formalin 10% untuk difiksasi. Jaringan yang telah difiksasi kemudian diproses dengan menggunakan alat tissue tex prosesor, 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 ° C, lalu dimasukkan ke dalam larutan xylol selama 15 menit, alkohol 96% selama 3 menit, dan kemudian dicuci bersih dengan air mengalir selama 10 menit. Jaringan kemudian siap untuk diberi cat utama yaitu *Hematoksilin Eosin* selama 10-15 menit, lalu dicuci kembali dengan air mengalir selama 15 menit. Masukkan ke dalam alcohol asam 1% sebanyak 2-5 celup, lalu ke dalam amoniak air 3-5 celup. Setelah itu diberi cat pembeding yaitu eosin 1% selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi dengan memasukkan ke dalam alkohol 80% selama 3 menit, alkohol 96% selama 3 menit, dan alkohol 96% selama 3 menit, kemudian dilakukan penjernihan dengan larutan xylol selama 15 menit sebanyak 2 kali, lalu mounting dengan entelan dan deck glass. Preparat siap digunakan.

4.7.9 Pengukuran Ketebalan PVAT

Ketebalan PVAT diukur menggunakan preparat aorta. Preparat aorta dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x, kemudian discan dengan menggunakan *software Scan Dot Slide Olyvia* pada computer. Setelah discan kemudian dilakukan pengukuran dengan menarik garis di 3 area yaitu area paling besar, sedang dan kecil. kemudian dari ketiga nilai area tersebut dirata-rata untuk mendapat nilai ketebalan PVAT.

4.8 Alur Penelitian



4.9 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 17 dengan tingkat signifikansi 0.05 ($p = 0.05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$). Langkah- langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif sebagai berikut :

1. **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. 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 Shapiro-Wilk karena jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini kurang dari 50 ($n \leq 50$). Uji Shapiro-Wilk dianggap lebih akurat ketika jumlah subjek yang kita miliki kurang dari 50. Data dikatakan memiliki persebaran normal jika $p > 0.05$.
2. **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 signifikansinya $p > 0.05$.

3. **Uji *One-way* ANOVA** (Uji *One-way* ANOVA dan Uji Post Hoc (menggunakan uji Tukey HSD)) : 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 apabila $p < 0.05$. Uji Post Hoc : untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji Post Hoc yang digunakan adalah uji Tukey HSD dengan tingkat signifikansi 95% ($p < 0.05$).

4. **Uji Korelasi** (Uji Korelasi *Pearson*) : pada penelitian ini menggunakan Uji Korelasi *Pearson*. Uji Korelasi *Pearson* untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala interval (parametrik). Pada uji korelasi *Pearson*, bila didapatkan:

1. Sig. ($p > 0,05$) : tidak ada korelasi antara dua variabel.
Sig. ($p < 0,05$) : ada korelasi antara dua variabel
2. Kekuatan korelasi $> 0,5$: korelasi yang cukup kuat
Kekuatan korelasi $< 0,5$: korelasi yang lemah
3. Arah korelasi positif (+) : searah. Semakin besar nilai suatu variabel, semakin besar pula nilai variabel lainnya.
Arah korelasi negatif (-) : berlawanan arah. Semakin besar nilai suatu variabel, semakin kecil nilai variabel lainnya.