

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental laboratory* secara in vivo yang artinya bahwa pada penelitian ini semua variabel yang mempengaruhi jalannya eksperimen akan dikontrol sehingga validitas internal (kualitas pelaksanaan rancangan penelitian) ini akan meningkat. Desain penelitian menggunakan pendekatan *post-test only control group design* untuk mengetahui pengaruh pemberian peptida polisakarida *Ganoderma lucidum* pada nilai resistensi insulin. Penelitian ini dilakukan dengan cara menguji pengaruh dari pemberian peptida polisakarida *Ganoderma lucidum* terhadap penurunan nilai resistensi insulin pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberikan HFD dan induksi STZ.

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Pengulangan

Pada penelitian ini digunakan sampel tikus wistar *Rattus norvegicus*. Rumus untuk menghitung estimasi jumlah pengulangan ditentukan oleh rumus Hanafiah (2012) yaitu :

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

t : jumlah perlakuan, pada penelitian ini t=5

r : jumlah sampel penelitian

Sehingga jumlah pengulangan yang dilakukan adalah:

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$r = 4,75 \text{ (dibulatkan 5)}$$

Jadi banyaknya pengulangan minimal 5 kali untuk setiap perlakuan. Dan pada masing-masing kelompok kontrol tikus diberikan 2 tikus sebagai cadangan. Sehingga jumlah tikus yang digunakan pada penelitian ini sejumlah 7×5 kelompok = 35 ekor hewan model.

4.2.2 Kriteria Sampel

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus wistar *Rattus norvegicus* berjenis kelamin jantan
- b. Umur \pm 6-8 minggu
- 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 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli 2013 sampai dengan bulan September 2013 di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang. Pembacaan kadar glukosa dan insulin plasma dilakukan di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah pemberian dosis ekstrak peptida polisakarida *Ganoderma lucidum*. Dalam penelitian ini digunakan dosis sebesar 50 mg/kgBB, 150 mg/kgBB, dan 300 mg/kgBB.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah nilai dari resistensi insulin yang dihitung dengan menggunakan *Insulin Sensitivity Index* (ISI).

4.5 Definisi Operasional

- Hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus strain* Wistar jantan berusia \pm 6-8 minggu.

- Diet tinggi lemak

Adalah pakan yang diberikan dengan komposisi 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% diberikan selama 8 minggu (Ratnawati *et al.*, 2012).

- Ekstrak peptida polisakarida *Ganoderma lucidum*

Pemberian kapsul PsP yang mengandung ekstrak polisakarida *Ganoderma lucidum* 250 mg dengan kandungan β -D-glukan 200 mg, hasil produksi mitra SLH-Labs Surabaya. Jumlah dari ekstrak PsP yang diberikan untuk perlakuan adalah 50 mg/kgBB, 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB diberikan selama 1 bulan.

- Nilai resistensi insulin

Indeks sensitifitas insulin diukur menggunakan rumus Insulin Sensitivity Index yang menggunakan hasil pengukuran glukosa darah puasa dan insulin plasma puasa. Pengukuran Insulin Sensitivity Index

(ISI) dengan menggunakan rumus $ISI = \ln(FBG \times FINS)^{-1}$, dimana FBG adalah kadar glukosa darah puasa dan FINS adalah kadar insulin plasma puasa (Li *et al.*, 1993).

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah :

1. Alat untuk pemeliharaan hewan coba: kandang ukuran 40x30x20 cm, sekam, pakan hewan coba (meliputi diet standard dan diet tinggi lemak), tempat minum.
2. Alat untuk perlakuan tikus: timbangan, sonde lambung, spuit insulin.
3. Alat untuk preparasi sampel darah: spuit insulin 3 ml, tabung hematokrit, tabung serologi 3 ml, pipet otomatis, blue tip, mikrotube, sentrifuse 10-50 mikroliter, label data.
4. Alat untuk membawa sampel: *cool box*, *dry ice*.
5. Alat untuk mengukur kadar glukosa darah: Blood Glucose Test Meter GlucoDr (All Medicus Co.Ltd.Korea).
6. Alat untuk mengukur kadar insulin plasma: spektrofotometer metode ELISA.

4.6.2 Bahan

1. Bahan Pakan

Bahan pakan yang diberikan adalah pakan normal yang dipergunakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

2. Sampel Plasma Darah

Didapatkan dari pemotongan pada ujung ekor (vena lateralis) dari hewan coba.

3. Streptozotocin

Penyuntikan STZ secara intraperitoneal dengan menggunakan spuit insulin dan pemberian ethanol 70%.

4. Glukosa Darah

Darah *whole blood* untuk pemeriksaan menggunakan alat *Blood Glucose Test Meter*.

5. Insulin Plasma

Darah *whole blood* untuk pemeriksaan menggunakan metode ELISA.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pengurusan Etik

Dilakukan sebelum melakukan penelitian, untuk memenuhi kelayakan etik penelitian di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7.2 Aklimasi/Adaptasi Hewan Coba

Tikus diaklimasi selama 1 minggu dengan diberikan pakan normal yang terdiri dari comfeed PARS, tepung terigu, dan air. Diet akan diberikan sebanyak 40 gram/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. Hasil dari sisa pakan, kemudian dihitung sebagai rata-rata asupan pakan harian tikus/kelompok/hari.

4.7.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Setelah mengalami aklimasi selama 1 minggu, tikus dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif yang diberi diet normal, kelompok kontrol positif yang diberi diet tinggi lemak, kelompok perlakuan yang diberi diet tinggi lemak dan diberi PSP dengan dosis masing-masing 50 mg/kgBB, 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB.

4.7.4 Pembuatan Pakan Diet Tinggi Lemak (*High Fat Diet*)

Setelah mengalami proses aklimasi, kelompok tikus kontrol negatif diberikan pakan diet normal. Cara pembuatan pakan diet normal adalah campuran ParS (dengan kandungan air, protein, lemak, serat, abu, Ca, Phospor, antibiotika, coccidiostat) 66,6% dan tepung terigu 33,4%, tambahkan air secukupnya dan aduk hingga merata. Kemudian bentuk bulatan dari pakan dan timbang pakan 40 gram/tikus/hari.

Sedangkan untuk tikus dari kelompok perlakuan diberikan pakan diet tinggi lemak. Cara pembuatan pakan diet tinggi lemak adalah campuran ParS 57,3%, tepung terigu 31,8%, kolesterol 1,9%, asam kolat 0,1%, dan minyak babi 8,9%, tambahkan air secukupnya dan aduk hingga merata. Kemudian bentuk bulatan dari pakan dan timbang pakan 40 gram/tikus/hari.

4.7.5 Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus tipe 2 dan Dislipidemia

Tikus diberi diet tinggi lemak 40 gram/tikus/hari. Kemudian setelah pemberian diet tinggi lemak pada minggu ke 4, tikus diinjeksi dengan STZ dosis rendah (30mg/kgBB) secara intraperitoneal sebanyak 1 kali injeksi. Sebelum dilakukan injeksi dilakukan

pengukuran pada kadar glukosa darah. Saat injeksi, tikus diposisikan menghadap ke arah frontal hingga terlihat abdomennya dan disemprot dengan ethanol 70%, kemudian kulit dicubit hingga terasa bagian ototnya, spuit dimasukkan pada bagian abdomen dan dicoba digerakkan. Apabila sudah terasa berat maka sudah masuk pada daerah intraperitoneal. Setelah yakin pada daerah intraperitoneal maka STZ dimasukkan secara perlahan. Selanjutnya, abdomen tikus disemprot dengan ethanol 70% kembali. Setelah induksi STZ ditunggu selama 1 minggu, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah untuk mengetahui apakah tikus telah mengalami peningkatan kadar glukosa darah yang merupakan kriteria dari diabetes melitus.

4.7.6 Prosedur Pembuatan Peptida Polisakarida *Ganoderma lucidum*

Kapsul PsP dalam bentuk sediaan *freeze dried* dimana setiap 250 mg PsP mengandung sekitar 80% β -D-glukan atau 200 mg. Sediaan PsP didapatkan dari mitra PT. Sahabat Lingkungan Hidup, Surabaya.

4.7.7 Prosedur Pemberian Peptida Polisakarida *Ganoderma lucidum*

PsP diberikan setiap hari pada tiga kelompok perlakuan dengan dosis yang berbeda, yaitu 50mg/kgBB, 150mg/kgBB, 300mg/kgBB, secara per oral selama 5 minggu dengan menggunakan spuit yang ujungnya dipasang sonde sehingga dapat masuk ke mulut tikus hingga ke lambung. PsP diberikan bersamaan dengan pemberian HFD. Pemberian PsP dilakukan setelah penyuntikan STZ dan pemberian HFD selama 4 minggu.

4.7.8 Prosedur Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Untuk pengukuran glukosa darah, dilakukan pemotongan pada ujung ekor (vena lateralis) untuk mengambil darah dari sampel tikus. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan menggunakan alat *Blood Glucose Test Meter* GlucoDr (All Medicus Co. Ltd. Korea). Kode alat diseti sesuai dengan kode dari GlucoDr TM. *Test Strip* yang digunakan. Untuk mengukur kadar glukosa, darah dari ekor tikus diteteskan pada strip yang terhubung dengan *glucometer* kemudian ditunggu selama 6 detik, lalu dilakukan pembacaan pada skala yang terdapat dilayar. Satuan yang digunakan dalam skala pengukuran glukosa darah yang terbaca adalah mg/dl.

4.7.9 Pembedahan Tikus

Setelah 12 minggu perlakuan, dilakukan pembedahan tikus. Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi yang diberikan adalah eter. Setelah tikus mati, ambil darahnya terlebih dahulu dengan spuit 1 ml dan disimpan dalam suhu beku $\pm 5^{\circ}\text{C}$ pada lemari pendingin agar tidak rusak.

4.7.10 Prosedur Pengukuran Kadar Insulin Plasma

Pengukuran kadar insulin plasma dilakukan setelah tikus telah diberikan terapi PsP untuk mengetahui kondisi resistensi insulinnya. Sebelum dilakukan pengambilan darah tikus dipuasakan selama 2 jam karena kadar insulin plasma yang diukur adalah kadar insulin plasma puasa. Sampel darah yang dipakai untuk pengukuran kadar insulin plasma adalah darah dari jantung tikus yang diambil pada saat pembedahan tikus. Pengukuran kadar insulin plasma menggunakan

metode ELISA dari Boehringer-Mannheim kit. Darah yang sudah diambil diberi antikoagulan/EDTA lalu diputar dengan menggunakan sentrifugator dengan kecepatan 3000 rpm selama 7 menit. Nilai normal untuk kadar insulin plasma <2500 picogram/ml.

4.7.11 Prosedur Perhitungan Nilai Resistensi Insulin

Perhitungan dari nilai Resistensi Insulin dilakukan dengan menggunakan *Insulin Sensitivity Index* (ISI) (Li *et al.*, 1993). Perhitungan dapat dilakukan sebagai berikut :

$$ISI = Ln (FBG \times FINS)^{-1}$$

Keterangan :

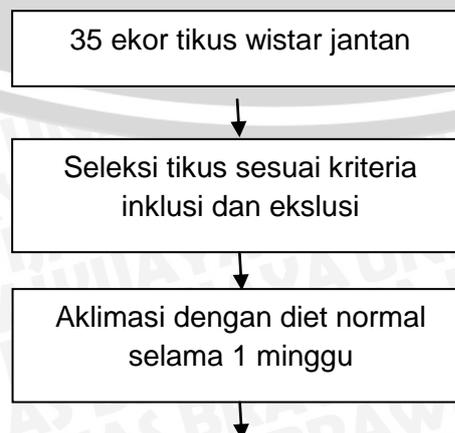
ISI : *Insulin Sensitivity Index*

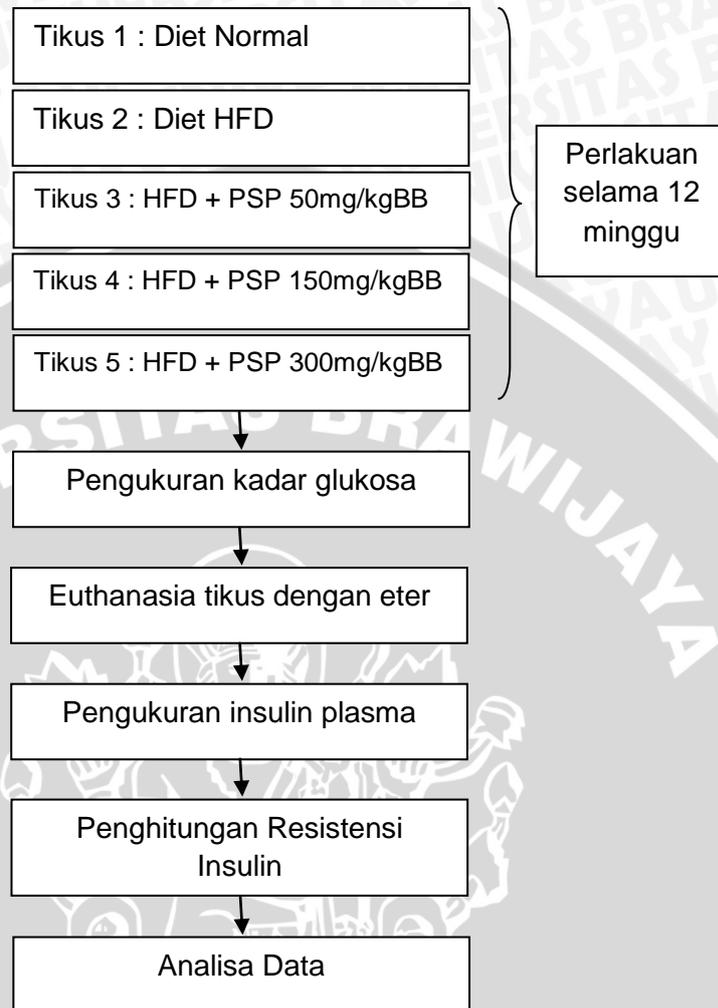
FBG : *Fasting Blood Glucose* (Glukosa Darah Puasa) (mmol/L)

FINS : *Fasting Insulin Plasma* (Insulin Plasma Puasa) (μ /L)

Interpretasi hasil dari perhitungan ISI yaitu apabila nilai < 1 (kurang dari 1), maka dikatakan mengalami resistensi insulin.

4.8 Alur Penelitian





Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.9 Analisa Data

Data yang diperoleh merupakan data kuantitatif dari hasil perhitungan *Insulin Sensitivity Index* (ISI) pada masing-masing kelompok kontrol tikus. Selanjutnya, data penelitian disajikan dalam $\text{mean} \pm \text{SD}$ dan dianalisis dengan menggunakan uji *one way ANNOVA* setelah memenuhi uji normalitas data (Kolmogrov Smirnov) dan uji homogenitas data (Levene Test). Semua perangkat analisis menggunakan fasilitas SPSS versi 16 dari *Windows*. Uji normalitas dan homogenitas data dikatakan normal apabila $p > 0,05$, sehingga penyajian menggunakan mean dan standar deviasi

sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Selanjutnya dilakukan uji *Tukey Test* untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing kelompok. Uji statistik dilakukan pada derajat kepercayaan 95% dengan $\alpha = 0,05$. Hasil uji statistik dinyatakan bermakna bila $p < 0,05$.

