

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan studi experimental murni dengan desain *Randomized Only Post-Test With Control Group Design* yang dikerjakan di laboratorium secara *in vivo* menggunakan hewan coba tikus *Sprague-Dawley* (SD). Penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian darapladip terhadap jumlah vasa vasorum aorta tikus *Sprague-Dawley* yang diberikan diet tinggi lemak selama 2 serial waktu yaitu 8 dan 16 minggu.

Pada penelitian ini terdiri dari 6 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (normal) minggu 8 dan 16, kelompok kontrol positif (dislipidemia) minggu 8 dan 16, serta kelompok perlakuan dislipidemia yang diberikan penghambat selektif Lp-PLA₂ (Darapladib) dengan dosis 20 mg/kg berat badan tikus SD selama 8 dan 16 minggu. Pemilihan 8 dan 16 minggu didasarkan penelitian pendahuluan sebelum dimulainya penelitian. Berdasarkan penelitian Marjorie dkk tahun 2010, membuktikan bahwa percobaan dengan hewan coba kelinci selama 8 minggu terjadi pertumbuhan plak, sedangkan 16 minggu terjadi progresifitas perkembangan plak semakin parah, hal ini dapat diketahui dari proses terjadinya kerusakan endotel pembuluh darah oleh plak aterosklerosis (Marjorie, *et al.*, 2010).

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Kriteria Sampel

Dalam penelitian ini menggunakan tikus *Sprague-Dawley* (SD), karena mampu menginduksi aterosklerosis dengan pemberian diet *high fat diet* (HFD). Menurut beberapa ilmiah dikatakan bahwa SD merupakan model tepat untuk hewan coba. *Sprague-Dawley* merupakan model transgenik munculnya insulin dan DMT2 seperti pada manusia melalui induksi dengan HFD dan *streptozotocin* (STZ) dosis rendah (Srinivasan, *et al.*, 2005)

Tikus SD yang digunakan pada penelitian berbobot 150-200 gram, usia 6-8 minggu, jantan, sehat ditandai dengan pergerakan aktif, bulu dan mata bersih diperoleh dari Institut Pertanian Bogor. Pemilihan tikus harus yang sehat, tidak ada kelainan anatomi, tidak mengalami diare selama masa penelitian, tidak mati dan sakit selama masa perlakuan, dan mau makan diet yang diberikan. Untuk memperoleh variabilitas dari tikus yang digunakan sebagai sampel ulangan penelitian, maka tikus tiap kelompok dipilih dengan cara randomisasi sederhana.

4.2.2 Pengulangan Sampel

Penelitian ini terdiri dari 6 kelompok perlakuan, yang terdiri dari kontrol negatif, kelompok kontrol positif (Dislipidemia), serta kelompok perlakuan yang diberikan *high fat diet* dan penghambat selektif Lp-PLA₂ (Darapladip) dengan dosis 20mg/KgBB tikus *Sprague-Dawley*. Srtiap kelompok terbagi menjadi 2 serial waktu yaitu 8 dan 16 minggu. Menurut Ridwan tahun 2013 menyatakan bahwa perhitungan pengulangan tiap kelompok ditentukan dengan rumus Federrer.

Berikut ini adalah rumus yang digunakan dalam menghitung pengulangan tiap kelompok,

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

Rumus 4.1 Rumus Federrer

Keterangan :

t = jumlah perlakuan/ *treatment*
 r = jumlah replikasi/ulangan,

Berdasarkan rumus diatas didapatkan bahwa jumlah minimal tikus yang digunakan dalam tiap kelompok adalah r kurang dari sama dengan empat, sehingga jumlah ulangan yang dibutuhkan ada sekitar empat. Namun dalam mengantisipasi jika tikus mati saat penelitian berlangsung, maka ditambahkan 1 ekor lagi sehingga jumlah sampel yang diperlukan tiap kelompok adalah lima ekor.

Tabel 4.1 Alokasi sampel untuk tiap kelompok

Kelompok	Macam Diet, Lama Perlakuan
Kontrol negatif (N 8)	Diet Standar , 8 minggu
Kontrol negatif (N 16)	Diet Standar, 16minggu
Kontrol positif (HFD 8 minggu)	HFD, 8 minggu
Kontrol positif (HFD 16 minggu)	HFD, 16 minggu
Kelompok HFD dan Darapladib (8 minggu)	HFD + DP 20 mg/kg/hari; p.o, 8 minggu
Kelompok HFD dan Darapladib (16 minggu)	HFD + DP 20 mg/kg/hari; p.o, 16 minggu

4.2.3 Kriteria Drop Out

Tikus dinyatakan *drop out* apabila tidak sesuai dengan kriteria, tikus mati, sakit selama perlakuan, dan tikus yang tidak mau makan.



4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Lembaga Studi Ilmu Hayati (LSIH) Biosains dan Laboratorium Patologi Anatomi (PA) FKUB. Penelitian ini dilakukan dengan 2 serial waktu yaitu 8 minggu dan 16 minggu. Penelitian selanjutnya dianalisis data sesuai parameter yang telah ditentukan.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini dapat di bagi menjadi;

1. Variabel bebas (Independen) dalam penelitian ini adalah pemberian Darapladip (DP) sebagai inhibitor selektif Lp-PLA₂ dengan dosis 20 mg/KgBB tikus.
2. Variabel terikat (Dependen) pada penelitian ini adalah jumlah vasa vasorum
3. Variabel pengendali merupakan variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti dalam melakukan penelitian, terdiri dari jenis tikus, usia, jenis kelamin, berat badan, pemberian diet tinggi lemak, dan kondisi lingkungan kandang.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Kandang Hewan Coba

Tikus *Sprague-Dawley* (SD) diletakkan dalam kandang berukuran 40x30x20 cm yang dilengkapi tempat makan dan minumannya. Kandang terbuat

dari *fiber glass*, dengan pengatur suhu dan kelembaban digital. Lantai kandang beralaskan serutan kayu yang telah disterilkan dengan autoklaf pada suhu sekitar 80°C. Tingkat aktivitas fisik tikus. Kebersihan kandang dijaga setiap hari dan alas kandang diganti setiap 3 hari. Setiap kandang diisi 1 ekor tikus yang dipelihara dalam lingkungan dengan perlakuan yang sama, yaitu suhu ruangan diatur pada kisaran 24-26 °C, kelembaban 55 ± 5 % dengan siklus gelap dan terang masing-masing 12 jam.

4.5.2 Pakan Tikus

4.5.2.1 Pakan Standar

Pakan standar (PS) diberikan selama masa aklimasi untuk semua kelompok dan untuk kelompok kontrol negatif selama masa pengamatan. Pakan standar yang digunakan adalah pakan yang direkomendasikan oleh *American Institute of Nutrition (AIN)-93*. Alat yang digunakan dalam pembuatan diet normal standar AIN-93M yaitu: timbangan, mangkok, baskom, gelas ukur, *mixer*, panci, kompor, sendok, spatula, loyang, plastik, *freezer*. Untuk komposisi diet g/kg yang dibutuhkan tanpa mengubah anjuran persen zat gizi makro per gram pakan. Setiap harinya diberikan pakan 26 gram. Komposisi dan prosedur pembuatan di lampiran 2. Pakan standar (PS) diberikan selama masa aklimatisasi untuk semua kelompok dan untuk kelompok kontrol negatif selama masa pengamatan.

4.5.2.2 Pakan Aterogenik (*High Fat Diet*)

Penelitian dengan model dislipidemia menggunakan diet kolesterol hewan coba dengan model obesitas pasti diberikan pakan HFD (*high fat diet*). Pemberian HFD akan menimbulkan tikus menjadi gangguan metabolik yang

mirip dengan gangguan pada manusia (Buettner, *et al.*, 2007). Tiap harinya diberikan pakan sebesar 26 gram. Komposisi HFD yang diberikan yaitu Pars 62%, tepung terigu 20%, kolesterol 1%, asam kolat 0,2%, korsvet 16,8%). Perbandingan pakan HFD dalam penelitian ini yaitu 40% karbohidrat, 42% lemak, dan 18% protein. Komposisi dan prosedur pembuatan di lampiran 1.4. Pakan aterogenik (HFD) diberikan untuk kelompok kontrol positif dan kelompok dislipidemia yang diberikan Darapladib selama masa pengamatan.

4.5.3 Kebutuhan Darapladib

Darapladib merupakan oral selektif inhibitor Lp-PLA₂ yang berguna dalam menghambat proses aterosklerosis. Pemberian oral selektif inhibitor Lp-PLA₂ dalam penelitian ini dipilih dosis 20 mg/kgBb tikus, hal ini didasarkan oleh pemilihan dosis tengah sesuai penelitian Tselepsi, *et al.*, 2011. Perhitungan kebutuhan Darapladib berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\text{Dosis Darapladib(mg)} \times \text{BB tikus (kg)} \times \text{jumlah tikus (ekor)} \times \text{waktu perlakuan (hari)}$$

Rumus 4.2 Rumus perhitungan total Darapladib yang digunakan tiap perlakuan

Tabel 4.2 Total kebutuhan Darapladib yang dibutuhkan dalam penelitian

Kelompok perlakuan	Rumus	Total
DL+DP 8 minggu	20mg x 0,2 kg x 5 ekor x 56 hari	1.120 mg
DL+DP 16 minggu	20mg x 0,2 kg x 5 ekor x 112 hari	2.240 mg
Total Darapladib yang dibutuhkan		3. 360 mg

Keterangan : 8 minggu = 56 hari, dan 16 minggu = 112 hari

4.5.4 Alat dan bahan lain dalam penelitian

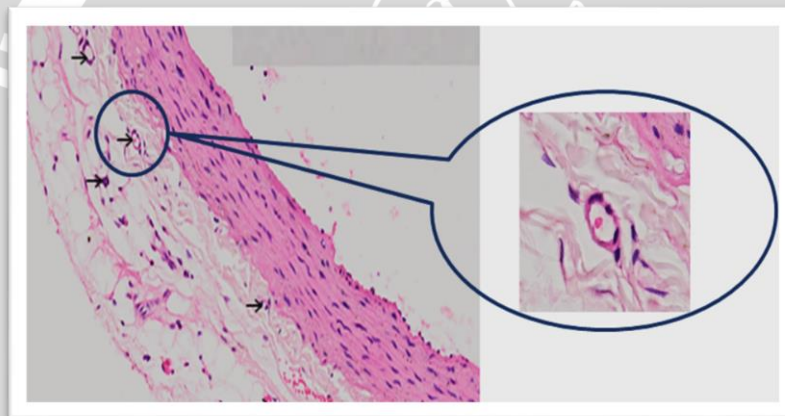
Pada penelitian ini membutuhkan beberapa alat dan bahan seperti;

- 1) Neraca elektrolit untuk menimbang sisa pakan tikus
- 2) Spuit 5 cc untuk pengambilan sampel darah tikus
- 3) Sonde untuk pemberian Darapladib pada tikus
- 4) Peralatan pembedahan (papan bedah, gunting, jarum pentul, botol organ).
- 5) Peralatan untuk fiksasi jaringan dan pencucian.
- 6) Darapladib dengan dosis 20mg/KgBB tikus
- 7) Bahan yang digunakan untuk anestesi pembedahan
- 8) Formalin untuk pengawetan sediaan aorta.
- 9) Bahan pewarna Hematoksilin Eosin
- 10) Mikroskop dengan pembesaran 400x untuk pengamatan sediaan aorta.
- 11) Komputer dengan software dotslide Olyvia untuk perhitungan jumlah vasa vasorum aorta tikus *Sprague-Dawley* dan diamati dengan pembesaran 400x

4.6 Definisi Operasional

- a. Kadar profil lipid adalah pengukuran kadar kolesterol total, kolesterol HDL, dan kolesterol LDL/VLDL yang dinyatakan dalam mg/dL (skala ukur: rasio). Komposisi pakan HFD yaitu 40% karbohidrat, 42% lemak, dan 18% protein. Pakan diberikan tiap hari sebesar 26 gram.

- b. Pemberian Darapladib pada tikus *Sprague-Dawley* model Dislipidemia menggunakan sonde dengan dosis selektif inhibitor Lp-PLA₂ yaitu 20mg/KgBB tikus.
- c. Perhitungan jumlah vasa vasorum setelah pewarnaan menggunakan *Hematoxilin Eosin* kemudian diamati menggunakan software dot slide Olyvia pembesaran 400x. Vasa vasorum teridentifikasi dari karakteristik lumen aorta yang berisi eritrosit. Kemudian dihitung jumlah vasa vasorum setiap perlakuan dalam penelitian.



Gambar 4.1 Perhitungan 1 vasa vasorum dalam lapisan aorta yang diamati dengan software Olyvia dengan pembesaran 400x dengan pewarnaan *Hematoxilin Eosin* (HE).

4.7 Prosedur penelitian

Pada penelitian diawali dengan pengurusan etik (*ethical clearance*) terdiri dari proposal, formulir layak etik, dan penjelasan etik penelitian. Langkah selanjutnya yaitu masa aktimasi (penyesuaian) tikus seluruh subjek penelitian di Laboratorium Sentral ilmu Hayati (LSIH) Biosains Universitas Brawijaya guna hewan coba yang dipih bisa beradaptasi dengan lingkungannya. Kemudian

pemberian pakan dan tahap randomisasi (pengacakan) tikus untuk dikelompokkan di masing-masing kelompok perlakuan.

4.7.1 Tahap persiapan

Persiapan dimulai dengan menyiapkan alat dan bahan penelitian serta seleksi tikus berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Tikus sebelumnya diaklimatisasi atau diadaptasi selama 2 minggu dengan diberi pakan normal yang terdiri dari comfeed pars, tepung terigu, dan air. Diet diberikan sebanyak 30 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 dilakukan aklimatisasi terhadap tikus, dilanjutkan proses pengacakan (randomisasi) pada masing-masing kelompok perlakuan.

4.7.2 Tahap perlakuan

Dalam kelompok perlakuan penelitian terdiri dari kelompok normal 8 dan 16 minggu, kontrol positif dengan pemberian *high fat diet* selama 8 dan 16 minggu, dan kelompok perlakuan yang diberikan *high fat diet* dan Darapladib dengan dosis 20mg/kgBB tikus selama 8 dan 16 minggu.

4.7.3 Pembedahan tikus

Setelah tahap perlakuan selama 8 atau 16 minggu, tikus dieuthanasia menggunakan ketamine 15-20 mg/kg per intra peritoneal, kemudian dilakukan pembedahan tikus. Pembiusan dan pembedahan dilakukan oleh peneliti dan staf laboratorium yang berpengalaman dan berkompetisi. Pembedahan dimulai dari bagian perut menggunakan gunting, bengkok. Setelah itu dilakukan pembedahan

aorta yang dibersihkan dengan PBS untuk menghilangkan sisa bekuan darah, kemudian diawetkan dengan formalin 10% dalam botol organ. Pemeriksaan histopatologi dengan prinsip organ yang telah difiksasi dengan formalin, dicuci, didehidrasi, dan dibuat blok dengan parafin (BPOM, 2014). Sisa bagian tubuh hewan coba yang tidak digunakan dikubur.

4.7.4 Pembuatan Preparat Aorta

Pengambilan sampel yaitu dari potongan arkus aorta tikus sekitar 2 cm. Aorta yang telah diambil kemudian dipotong dengan ketebalan $\pm 2-3$ mm, lalu dilanjutkan proses fiksasi dengan dimasukkan ke dalam formalin 10%. Jaringan yang telah difiksasi kemudian diproses menggunakan *tissue tex processor*, lalu diblok paraffin dan dipotong dengan mesin microtome dengan ketebalan 3-5 mikron. Kemudian diletakkan dalam oven selama 1-2 jam dengan suhu 60°C, lalu dimasukkan dalam xylol selama 15 menit, alkohol 96% selama 3 menit, dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit. Jaringan kemudian siap untuk diberi cat utama *Hematoxilin Eosin*.

4.7.5 Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) merupakan metode pewarnaan yang dapat mengidentifikasi berbagai bentuk jaringan, dan perubahan morfologi, serta dapat digunakan sebagai dasar diagnosis kanker (Fischer, *et al.*, 2008). HE berasal dari tanaman *Haematoxylon campechianum*, zat pewarna ini membutuhkan proses oksidasi untuk menghasilkan zat hematin dan digabung dengan mordant (garam metalik) guna menstabilkan jaringan dan pewarnaan. Metode pewarnaan HE mempunyai beberapa tahap yaitu :

1. Menyiapkan larutan *Ehrlich's haematoxylin*, HCL 1% dalam larutan alkohol 70%, dan eosin 1%.
2. Bersihkan jaringan dari lilin (wax) dan dihidrasi
3. Kemudian berikan cat *Ehrlich's haematoxylin* sekama 15 menit, lalu bilas dengan air
4. Lalu lakukan diferensiasi dengan HCL 1% dalam larutan alkohol 70% selama 1 menit dan bilas dengan air.
5. Selanjutnya pembuatan blueing (warna biru) pada jaringan dengan menggunakan air mengalir pada sediaan selama 10 menit atau dengan Scott's tap water selama 2 menit.
6. Kemudian diberikan pewarnaan eosin 1% sebagai counterstain dan bilas dengan air dan keringkan
7. Preparat diletakkan dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x.
8. Lalu scan preparat aorta tikus *Sprague-Dawley* simpan dalam folder.
9. Selanjutnya lakukan perhitungan jumlah vasa vasorum pada hasil scan *Dotslide* menggunakan komputer dengan software Olyvia dan diamati dengan pembesaran 400x
10. Pada pengamatan didapatkan vasa vasorum dengan gambaran lumen aorta yang berisi eritrosit

4.8 Pengukuran Profil Lipid

Pengukuran profil lipid (kadar kolesterol total, kolesterol HDL, dan kolesterol non HDL) diperlukan serum darah sebanyak 20 μ L, kemudian dimasukkan dalam tube 1,5 mL dan ditambahkan *precipitation reagent*. Pada pemeriksaan ini menggunakan metode metode kolorimetri menggunakan

enzychrom AF HDL and LDL/VLDL assay kit (E2HL-100). Setelah serum darah diberikan reagent, lalu dihomogenkan dengan vortex dan disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 9500xg. Kemudian transfer supernatan sebanyak 24 μ L secara perlahan ke dalam *tube* 1,5 mL baru, lalu tambahkan *assaybuffer* 96 μ L dan beri label "HDL". Selanjutnya tambahkan 40 μ L PBS ke dalam pellet dan dipipeting. Lakukan transfer campuran 24 μ L ke *tube* yang barud dan tambahkan *assay buffer* 96 μ L, lalu beri label "non-HDL". Pada kolesterol total dengan mentransfer 12 μ L serum sampel dan ditambahkan dengan 108 μ L *assay buffer*.

4.9 Metode Perhitungan Jumlah Vasa Vasorum

Vasa Vasorum diamati dengan pengecatan hematoksilin eosin (HE) dengan mikroskop BX 53 (*Olympus Corporation*) (Wihastuti, *et al.*, 2014). Pada *Difiore's Atlas of Histology*, vasa vasorum juga diamati menggunakan Hematoksilin eosin. Pada lapisan aorta tikus yang mengalami aterosklerosis dapat diamati menggunakan *Hematoksilin Eosin* dan *Oil Red O* (Andres-Manzano, *et al.*, 2015). Dalam mengamati vasa vasorum secara histopatologi akan lebih mudah menggunakan HE, kemudian diamati secara detail dengan mikroskop pembesaran 400x. Pada lapisan aorta yang mengalami penebalan intima oleh plak akan menunjukkan jumlah vasa vasorum semakin banyak. Hal ini menandakan proses neovaskularisasi dalam lapisan aorta terutama lapisan adventisia yang meningkat akibat jaringan mengalami hipoksia.

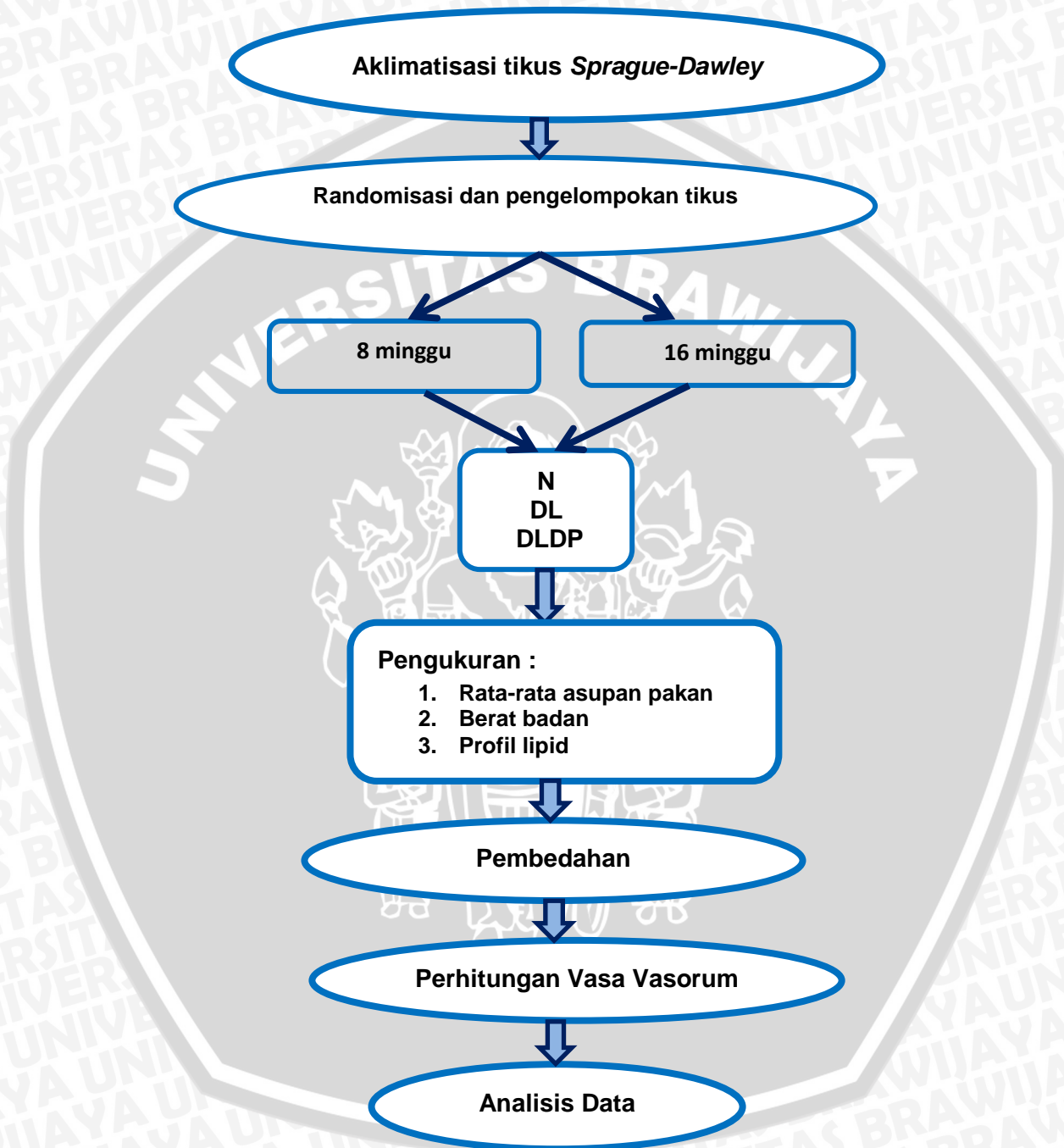
Perhitungan vasa vasorum dilakukan secara manual dengan software Olyvia dan diamati dengan pembesaran 400x. Peneliti menghitung seluruh lapang pandang. Untuk menghindari BIAS, maka dibutuhkan penghitung

tambahan. Kemudian dengan 2 hasil perhitungan vasa vasorum, maka dilakukan uji *Intraclass Correlation Coefficient* dengan SPSS. Hasil uji *Intraclass* akan bernilai baik jika hasilnya mendekati ± 1 . Namun jika kurang dari 1 atau lebih dari 1 maka diperlukan perhitungan ulang dan pemahaman konsep terhadap variable yang diteliti.

4.10 Analisa Data

Pada proses analisa data diawali dengan analisa deskriptif dengan menguji homogenitas dengan menggunakan uji Levene. Ketika hasil penelitian uji homogenitas ($p \geq 0,05$), kemudian dilanjutkan dengan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* agar mengetahui kenormalan atau tidak dalam penelitian (normal jika $p \geq 0,05$). Untuk mengetahui perbedaan jumlah vasa vasorum yang signifikan antara kelompok perlakuan tikus yang menerima Darapladib dan *high fat diet* (HFD) dan yang tidak diberikan Darapladib menggunakan uji *One-way ANOVA*. Jika dalam penelitian didapatkan perbedaan yang signifikan (minimal 2 kelompok perlakuan) perlu dilakukan uji *Post Hoc* guna mengidentifikasi kelompok yang mengalami perbedaan dan uji korelasi untuk mengetahui perbedaan jumlah vasa vasorum minggu 8 dan 16. Kemudian dilakukan uji korelasi guna mengetahui korelasi minggu ke 8 dan 16 terhadap jumlah vasa vasorum yang telah diberikan Darapladib 20 mg/kg BB tikus.

4.11 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian Tikus *Sprague-Dawley* Model Dislipidemia

Keterangan :

- N : kelompok normal
- DL : kelompok dislipidemia
- DLDP : kelompok dislipidemia dengan pemberian Darapladib

