

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain penelitian *Randomized Post Test Only with Controlled Group* secara *in vivo*, paralel 6 kelompok, menggunakan hewan coba tikus *Sprague-Dawley* (SD). Dipilihnya tikus tersebut berdasarkan atas beberapa laporan ilmiah terdahulu yang menyebutkan SD merupakan model yang sesuai untuk menginduksi aterosklerosis dengan pemberian diet aterogenik/*high fat diet* (HFD). SD adalah model non-genetik (transgenik) yang tepat pula untuk memperlihatkan perjalanan alamiah munculnya resistensi insulin dan DMT2 seperti pada manusia melalui induksi dengan HFD dan streptozotocin (STZ) dosis rendah (Srinivasan *et al.*, 2005; Wu dan Huan, 2007).

Enam kelompok hewan coba dalam penelitian ini meliputi kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif (diabetes mellitus tipe 2 /DMT2) serta kelompok perlakuan (DMT2 yang diberikan penghambat selektif Lp-PLA2 (Darapladib/DP) dengan dosis 20 mg/kg berat badan/hari. Ketiga kelompok tersebut kemudian dibagi kembali berdasarkan durasi penelitian yang dilakukan secara serial selama 8 dan 16 minggu. PS (Pakan Standar)/HFD diberikan kepada hewan coba untuk menilai perkembangan awal aterosklerosis pada semua kelompok.

4.2. Populasi dan Sampel

Tikus SD yang digunakan berbobot 150-160 gram, usia 6-8 minggu, jantan, sehat ditandai dengan pergerakan aktif, bulu dan mata bersih diperoleh dari Institut Pertanian Bogor. Untuk memperoleh variabilitas dari

tikus yang digunakan sebagai sampel/ulangan penelitian, maka tikus tiap kelompok dipilih dengan cara randomisasi sederhana.

Jumlah sampel/ulangan tiap kelompok pada penelitian ini sesuai rumus Federrrrer. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut : (Ridwan, 2013)

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

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15/5$$

$$r \geq 4$$

t = jumlah perlakuan/treatment dan r = jumlah replikasi/ulangan

Berdasarkan rumus diatas, jumlah minimal tikus yang digunakan dalam tiap kelompok adalah 4 ekor. Mengingat potensi resiko kematian dan kegagalan maka ditambahkan satu ekor lagi sebagaiantisipasi sehingga ditetapkan ulangan sebesar 5 ekor tikus setiap kelompok.

Enam kelompok perlakuan adalah sebagai berikut ini (masing-masing 5 ekor tikus):

Tabel 4.1. Alokasi Sampel untuk Setiap Kelompok

Kelompok	Jumlah Ulangan	Macam Diet, Lama dan Jenis Perlakuan
N 8	5	Diet Standar , 8 minggu
N 16	5	Diet standar, 16 minggu
DM 8	5	HFD, 8 minggu
DM 16	5	HFD, 16 minggu
DM + DP 8	5	HFD + DP 20 mg/kg/hari; p.o, 8 minggu
DM + DP 16	5	HFD + DP 20 mg/kg/hari; p.o, 16 minggu

Keterangan:

N8 : Kelompok normal 8 minggu; N16: Kelompok normal 16 minggu; DM8 : Kelompok DMT2 8 minggu; DM16: Kelompok DMT2 16 minggu; DM+DP8 : Kelompok DMT2 yang diberi Darapladib selama 8 minggu; DM+DP16 : Kelompok DMT2 yang diberi Darapladib selama 16 minggu

Sehingga, total dari seluruh sampel yang digunakan adalah 30 ekor tikus *Sprague-Dawley*.

4.3. Kriteria Sampel

4.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus *Sprague-Dawley* berjenis kelamin jantan
- b. Umur 6-8 minggu
- c. Berat badan sekitar 150-200 gram
- d. Kondisi sehat dan tidak ada kelainan anatomik

4.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus mati dan sakit selama masa perlakuan
- b. Tikus yang tidak mau makan selama penelitian

4.3.3 Variabel Penelitian

4.3.3.1 Variabel Terikat (*dependent*)

Variabel terikat penelitian ini adalah jumlah sel busa pada aorta tikus *Sprague-Dawley*

4.3.3.2 Variabel Bebas (*independent*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Darapladib

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Lembaga Studi Ilmu Hayati-Pusat Biosains dan pengukuran jumlah sel busa dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi (PA) FKUB. Waktu penelitian mulai dari tanggal 6 Oktober 2015 saat pertama kali diberi HFD dan diberikan Darapladib. Penelitian diakhiri pada tanggal 11 Februari 2016 ketika tikus terakhir dibedah. Kemudian, dilakukan analisis data sesuai parameter yang telah ditentukan.

4.5. Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Alat yang diperlukan antara lain:

1. Kandang untuk tikus subjek penelitian berukuran 40x30x20 cm beserta perlengkapan minum tikus
2. Neraca elektronik untuk menimbang sisa pakan tikus

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. Tikus *Sprague-Dawley* berusia 6-8 minggu dengan berat 150-200 gram
2. Pakan standar tikus

4.5.2 Pembuatan Model Tikus Diabetes Mellitus Tipe 2

Alat yang diperlukan antara lain:

1. Kandang untuk tikus subjek penelitian berukuran 40x30x20 cm beserta perlengkapan minum tikus
2. Neraca elektronik untuk menimbang sisa pakan tikus

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. Tikus *Sprague-Dawley*
2. Pakan HFD (*High Fat Diet*) yang terdiri dari ParS 62%, tepung terigu 20%, kolesterol 1%, asam kolat 0,2%, dan korsi 16,8%
3. Streptozotocin 30 mg/kg
4. *Sprit* 1 cc untuk pengambilan sampel darah tikus
5. Glukometer (GlucoDr Co.Ltd.Korea)

4.5.3 Pemeliharaan Tikus

Alat yang diperlukan antara lain:

1. Kandang untuk tikus subjek penelitian berukuran 40x30x20 cm beserta perlengkapan minum tikus

2. Neraca elektronik untuk menimbang sisa pakan tikus
3. Sonde untuk pemberian Darapladib pada tikus
4. *S spuit* 1 cc untuk pengambilan sampel darah tikus untuk pemeriksaan kadar insulin plasma akhir masa perlakuan
5. Glukometer (GlucoDr Co.Ltd.Korea)

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. Tikus *Sprague-Dawley*
2. Pakan standar tikus
3. Pakan HFD (*High Fat Diet*) yang terdiri dari ParS 62%, tepung terigu 20%, kolesterol 1%, asam kolat 0,2%, dan korsvet 16,8%
4. Darapladib

4.5.3 Pembedahan

Alat yang diperlukan antara lain:

1. Papan bedah
2. Gunting bedah
3. Pinset
4. Jarum pentul
5. Kapas
6. Botol organ
7. Peralatan untuk pencucian dan fiksasi jaringan

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. Tikus *Sprague-Dawley*
2. Larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*)
3. Ketamin
4. Formalin 10%
5. Alkohol

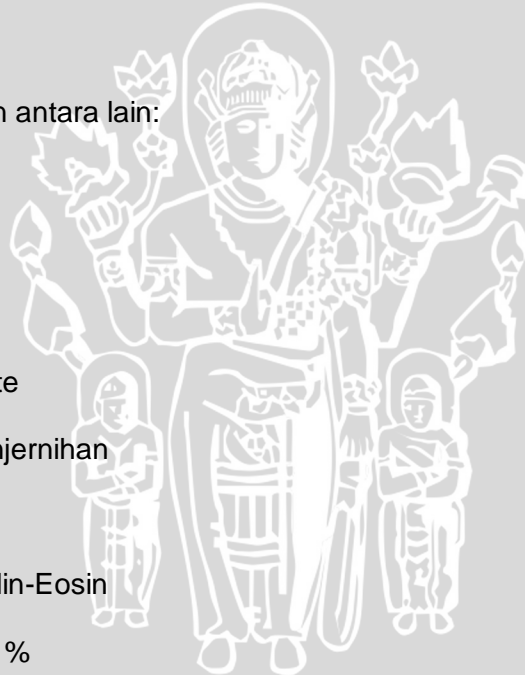
4.5.4 Pembuatan *Slide* Histopatologi

Alat yang diperlukan antara lain:

1. Inkubator
2. *Object glass* dan *cover glass*
3. Mikrotom
4. Pinset
5. *Automatic processor*
6. *Waterbath*
7. *Casette* untuk pembuatan paraffin blok
8. *Cold plate*

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. Formalin 10%
2. Alkohol 80%
3. Alkohol 96%
4. Alkohol absolute
5. Xylol untuk penjernihan
6. Paraffin
7. Cat Hematoksilin-Eosin
8. Alkohol asam 1%
9. Amoniak air
10. Entelan



4.5.5 Penghitungan Jumlah Sel Busa

Alat yang diperlukan antara lain:

1. Mikroskop dengan perbesaran 400x untuk pengamatan sediaan aorta
2. Komputer dengan software *Dot Slide Olyvia™* untuk melakukan penghitungan sel busa dari aorta tikus

Bahan yang diperlukan antara lain:

1. Slide jaringan aorta hasil pewarnaan dengan hematoksilin-eosin

4.6. Definisi Operasional

Tabel 4.2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
Darapladib	Darapladib adalah penyekat enzim Lp-PLA ₂ dalam bentuk serbuk <i>crystalline</i> solid yang diberikan secara sonde setiap hari dengan dosis 20 mg/kg/hari tikus	mg/kg	Rasio
Sel Busa (<i>Foam Cell</i>)	Sel busa adalah sel makrofag yang memfagositosis OxLDL sehingga terjadi akumulasi droplet lipid intraseluler makrofag yang memberikan gambaran <i>foamy</i> atau seperti busa. Perhitungan sel busa dilakukan setelah diberi cat <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE). Identifikasi sel menggunakan mikroskop perbesaran 400x dengan ciri-ciri : sel dengan sitoplasma pucat dan inti berwarna biru atau merah pada tunika intima	sel/aorta	Rasio
Tikus Model Aterosklerosis Diabetes Mellitus Tipe 2	Aterosklerosis adalah proses inflamasi kronis dinding pembuluh darah yang ditandai dengan pembentukan plak yang tersusun atas deposit lipid, <i>debris</i> seluler, dan matriks ekstraseluler. Faktor resiko	mg/dL	Rasio

	<p>utama aterosklerosis salah satunya adalah diabetes mellitus tipe 2 (DMT2), DMT2 memiliki karakteristik berupa hiperglikemia kronis dengan mekanisme dasar berupa resistensi insulin dan atau sekresi insulin yang inadkuat. Untuk memastikan terjadinya DM tipe 2 pada hewan coba tikus <i>Sprague-Dawley</i> dilakukan pengukuran kadar glukosa darah dengan glukometer, pengukuran kadar insulin, dan perhitungan resistensi insulin menggunakan rumus HOMA-IR yang dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya</p>		
--	--	--	--

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1 Membuat Surat Kelaikan Etik

Penelitian ini diawali dengan pengurusan etik (*ethical clearance*) yang meliputi pengajuan proposal, formulir laik etik, dan penjelasan etik penelitian yang kemudian dievaluasi oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7.2 Persiapan Hewan Coba

Persiapan hewan coba dimulai dengan mempersiapkan alat dan bahan penelitian dan dilakukan seleksi tikus berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan. Kemudian, dilanjutkan dengan masa aklimatisasi tikus subjek penelitian di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH)

Biosains Universitas Brawijaya selama 1 minggu agar tikus menjadi terbiasa dengan lingkungan baru sehingga siap untuk diteliti. Seluruh tikus diberi pakan standard yang terdiri dari comfeed PARS, tepung terigu, dan air sebanyak 26 g/tikus/hari. Pemberian pakan dilakukan setiap hari dan diganti pada 24 jam berikutnya serta dilakukan penimbangan sisa pakan. Kemudian dihitung selisih antara jumlah pakan yang diberikan dengan sisa pakan, hasilnya kemudian dicatat sebagai rata-rata asupan pakan harian tikus/ kelompok/ hari.

4.7.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Setelah masa aklimatisasi selama 1 minggu, tikus dipilih secara acak (randomisasi) supaya seluruh tikus memiliki kesempatan yang sama untuk mendapat perlakuan. Tikus dikelompokkan ke dalam masing-masing kelompok perlakuan yang terdiri dari kelompok kontrol negatif yang diberi pakan standar selama 8 dan 16 minggu, kontrol positif yang diberikan pakan tinggi lemak dan STZ selama 8 minggu, kontrol positif yang diberi pakan tinggi lemak dan STZ selama 16 minggu, kelompok perlakuan yang diberi pakan tinggi lemak, STZ, dan Darapladib selama 8 minggu, dan kelompok perlakuan yang diberi pakan tinggi lemak, STZ, dan Darapladib selama 16 minggu.

4.7.4 Pembuatan Bahan Diet yang Diberikan pada Tikus

Diet normal yang digunakan dalam penelitian ini berupa pakan standar (PS) AIN-93M (*American Institute of Nutrition*) dengan komposisi berupa tepung jagung, kasein, vitamin, mineral, kolin, gelatin, dan air. PS diberikan pada seluruh kelompok tikus sebagai pakan pada masa aklimatisasi selama satu minggu dan selama masa penelitian untuk kelompok kontrol negatif 8 dan 16 minggu.

Pakan HFD terdiri dari komposisi pakan ayam/ParS 62%, tepung terigu 20%, kolesterol 1%, asam kolat 0,2%, dan korsvet 16,8%. Diet tinggi lemak

diberikan untuk tikus kontrol positif dan tikus kelompok perlakuan yang diberi Darapladib selama masing-masing 3 minggu pada masa induksi model DMT2 ditambah 8 dan 16 minggu pada masa perlakuan.

4.7.5 Pembuatan Tikus Model Diabetes mellitus tipe 2

Setelah masa aklimatisasi, tikus diinduksi diabetes mellitus tipe 2 dengan diberi pakan HFD selama 3 minggu. Pada akhir minggu kedua, tikus dipuasakan semalam kemudian diukur kadar glukosa darah, insulin plasma, dan resistensi insulin. Darah untuk pemeriksaan tersebut diperoleh dari vena lateralis di ekor sebanyak 0,2 cc. Setelah itu tikus diinjeksi dengan streptozotocin (STZ) secara intraperitoneal dosis rendah (30mg/kg) dan diukur kembali kadar glukosa darah, insulin plasma, dan resistensi insulin satu minggu kemudian. Tikus yang mengalami resistensi insulin dinyatakan sebagai model DMT2 dan dipakai untuk prosedur penelitian lebih lanjut.

Setelah tikus dipastikan mengalami DM tipe 2 kemudian dilakukan pengacakan ke dalam kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan.

4.7.6 Prosedur Pemberian Darapladib

Setelah 3 minggu pemberian diet tinggi lemak dan induksi STZ *low dose* (30 mg/kg). Tikus diberi Darapladib selama 8 atau 16 minggu sesuai dosis yang telah ditentukan yaitu sebesar 20 mg/kg/hari setiap harinya menggunakan sonde.

4.7.7 Pembedahan Tikus

Setelah 8 atau 16 minggu perlakuan, tikus dieuthanasia dengan cara disuntikan ketamin 15-20 mg/kg secara intra peritoneal. Setelah tikus tidak sadar, tikus diposisikan pada papan bedah menggunakan *pins*. Dibedah mulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok. Setelah itu, dilakukan pembedahan tikus untuk mengambil aorta dan dibersihkan dengan larutan

PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) dan PFA (*Paraformaldehyde*) kemudian diawetkan dengan menggunakan formalin 10% dalam botol organ.

4.7.8 Pembuatan Slide Histopatologi Aorta

Sampel yang diambil adalah potongan arkus aorta. Aorta yang telah diambil kemudian dipotong dengan ketebalan $\pm 2-3$ mm dan selanjutnya dimasukkan ke dalam formalin 10% untuk difiksasi selama semalam. Jaringan yang terfiksasi tersebut kemudian diletakkan di tempat paraffin blok. Semua tempat paraffin dijadikan satu di dalam sebuah wadah lalu dibilas dengan air sebentar. Selanjutnya diproses dengan alat *automatic tissue tex processor* selama 30 detik. Kemudian, diblok dengan paraffin sampai menutupi seluruh jaringan, lalu diletakkan di atas *cold plate* untuk mempercepat proses pembekuan, dan dipotong menggunakan mesin *microtome* dengan ketebalan sebesar 3-5 μm , kemudian potongan tersebut diletakkan di atas permukaan air dalam *waterbath* bersuhu 46°C dan irisan dirapikan lalu diletakkan di atas *object glass*. Selanjutnya diletakkan dalam oven selama 1-2 jam dengan suhu 60°C dan dimasukkan ke dalam larutan xylol selama 15 menit, alkohol 96% selama 3 menit, kemudian dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit. Setelah itu jaringan siap untuk dilakukan pengecatan menggunakan cat utama hematoksilin selama 10-15 menit, lalu dicuci kembali dengan air mengalir. Masukkan dalam alkohol asam (HCl 1% dalam alkohol 70%) sebanyak 2-5 celup, lalu ke dalam amoniak air 3-5 celup. Setelah itu diberi *counter stain* eosin 1% selama 1 menit. Kemudian dilakukan proses dehidrasi dengan memasukkan ke dalam alkohol 80% selama 3 menit, alkohol 96% selama 3 menit, dan alkohol 96% selama 3 menit, dan dilakukan penjernihan dengan xylol selama 15 menit sebanyak dua kali. Kemudian diakhiri dengan *mounting* dengan entelan dan *deck glass*.

4.7.9 Penghitungan Jumlah Sel Busa

Penghitungan jumlah sel busa dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x pada seluruh lapangan pandang untuk setiap sediaan pada satu *slide* aorta dan dinyatakan dengan satuan sel/aorta (Heriansyah, 2016; Lohoefer, 2012). Sel busa teridentifikasi sebagai sel dengan sitoplasma pucat dan inti berwarna biru di bawah lapisan endotel (Baranska, 2014). Penghitungan jumlah sel busa dilakukan oleh lebih dari satu pemeriksa dengan metode *double blind* untuk mengurangi bias serta guna mendapatkan hasil yang lebih objektif. Sedangkan untuk mengurangi *error* dalam penelitian digunakan *software dotSlide Olyvia™* sehingga resiko terjadi *overlap* perhitungan dapat diminimalisir.

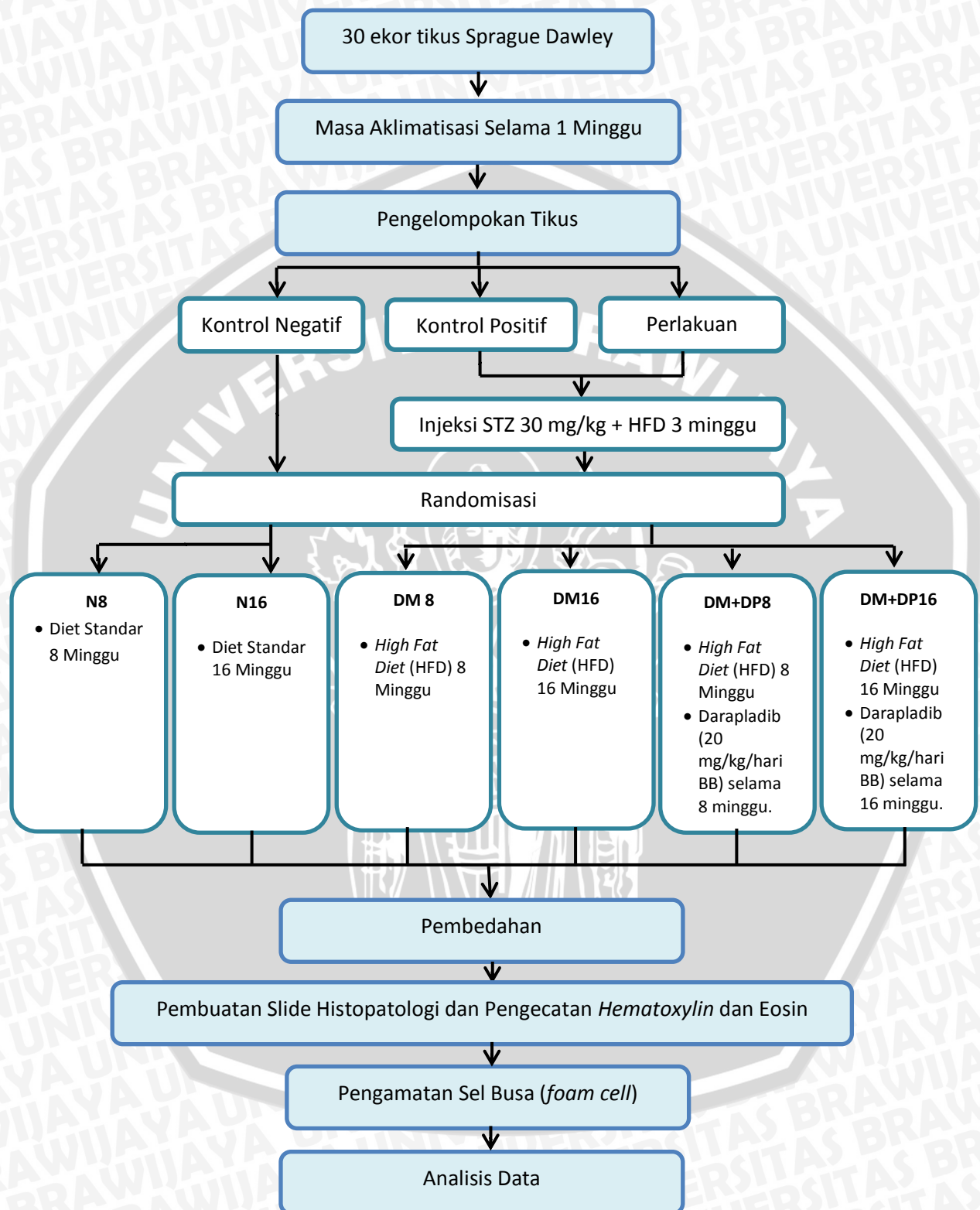
4.8. Analisis Data

Pengambilan dan analisis data dilakukan setelah fase penelitian. Teknik pengolahan dan analisis data dilakukan dengan menggunakan program *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS)* versi 23 dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif sebagai berikut :

- a. Uji Normalitas (menggunakan uji *Saphiro-Wilk*): untuk menginterpretasikan suatu data apakah data memiliki persebaran data yang normal atau tidak karena uji hipotesis tergantung pada normal atau tidaknya distribusi data. Apabila didapatkan sebaran data normal maka dilanjutkan sebagai uji parametrik. Namun apabila sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik. Pada penelitian ini digunakan uji *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel penelitian yang kurang dari 50 ($n \leq 50$). Data dinyatakan memiliki persebaran normal dengan $p > 0,05$.

- b. Uji Homogenitas (menggunakan uji varians Levene's test) : untuk menentukan apakah distribusi beberapa set data memiliki varians yang homogen. Apabila didapatkan data memiliki varians homogen maka analisis data dilanjutkan dengan uji ANOVA. Suatu data dinyatakan memiliki varians homogen dengan nilai signifikansi $p > 0,05$.
- c. Uji *Repeated* ANOVA (dan uji *Post-Hoc* LSD dan Duncan) : uji *repeated* ANOVA dilakukan untuk melakukan uji beda terhadap lebih dari dua kelompok data yang berpasangan. Perbedaan pada dua kelompok dinyatakan bermakna dengan nilai $p < 0,05$. Kemudian analisis data dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil ANOVA.





Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian