

III. METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *true experimental* dengan *pre-post test with randomized control group design*. Pemilihan subjek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan metode random sampling. Penelitian ini menggunakan mencit jantan galur ddY yang dibagi menjadi 4 kelompok. Terdiri atas kelompok kontrol normal (K1), kelompok kontrol obesitas (K2), kelompok pemberian pakan tempe 2 gr/hari (KP1) dan kelompok pemberian pakan tempe 4 gram/hari (KP2).

3.2. Tempat dan Waktu

3.2.1. Tempat

Pemeliharaan mencit dilakukan di *animal house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pengambilan dan pengukuran gula darah puasa dilakukan di Laboratorium Biologi-Biokimia Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.2.2. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan September sampai bulan Oktober 2015.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus L.*) jantan galur ddY berusia 6-8 minggu dengan berat badan rata-rata 20-40 gram. Mencit diperoleh dari Institut Pertanian Bogor (IPB).

3.3.2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 20 ekor mencit. Dimana dibagi atas 4 kelompok. Sesuai rumus Federer, rumus penentuan besar sampel untuk uji eksperimental rancangan acak lengkap (RAL) adalah:

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

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini akan menggunakan 4 kelompok sehingga perhitungan sampel menjadi :

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Jadi sampel yang digunakan pada tiap kelompok adalah 5 ekor mencit jantan ($n \geq 4,75$). Sehingga pada penelitian ini digunakan 20 ekor mencit jantan dan dibagi menjadi empat kelompok secara acak. Pembagian empat kelompok mencit, yaitu :

- Kelompok K1 : 5 mencit kontrol normal yang diberi pakan standar dan minum secara *ad libitum*
- Kelompok K2 : 5 mencit kontrol obesitas yang diberi pakan tinggi lemak tinggi protein dan minum secara *ad libitum*
- Kelompok KP1 : 5 mencit obesitas yang diberi pakan tinggi lemak tinggi protein + tempe 2gr/hari dan minum secara *ad libitum*
- Kelompok KP2 : 5 mencit obesitas yang diberi pakan tinggi lemak tinggi protein + tempe 4gr/hari dan minum secara *ad libitum*.

3.3.3. Kriteria Penelitian

a. Kriteria inklusi :

- 1) Mencit jantan galur ddY obesitas
- 2) Berumur 6-8 minggu
- 3) Berat badan mencit normal rata-rata 20-30 gram
- 4) Berat badan mencit obes rata-rata 31- 40 gram
- 5) Bergerak aktif
- 6) Bulu tidak kusam, tidak mudah rontok

7) Tidak tampak adanya kelainan anatomis ataupun bekas luka.

b. Kriteria eksklusi :

- 1) Terjadi penurunan berat badan selama proses pemeliharaan lebih dari 10% dari awal penelitian
- 2) Tampak sakit selama proses pemeliharaan (gerak terbatas, bulu terlihat kusam, terdapat luka gigitan, kotoran cair).

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat

- a. Timbangan analitik
- b. Gunting
- c. Alat tulis
- d. Glukometer
- e. Kandang mencit
- f. Tempat makan mencit

3.4.2. Bahan

- a. Tempe kedelai
- b. Pakan standar mencit
- c. Pakan tinggi lemak tinggi protein
- d. Aquades
- e. Strip glukometer

3.5. Identifikasi variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.5.1. Identifikasi Variabel

1. Variabel perlakuan adalah pemberian tempe dengan dosis 2 gram/hari dan 4 gram/hari
2. Variabel respon pada penelitian ini adalah perubahan kadar glukosa darah puasa mencit jantan galur ddY.

3.5.2. Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan penjelasan dan memperlihatkan variabel-variabel yang terlibat dalam penelitian ini, maka diberikan definisi konsep dan operasional sesuai dengan tujuan penelitian ini.

Tabel 9. Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat ukur (satuan)	Hasil Ukur	Jenis Variabel
1	Tempe	Tempe yang digunakan dalam penelitian ini adalah tempe kedelai kuning. Yang berasal dari fermentasi kedelai kuning akibat aktivitas mikroorganisme, dan perubahan enzim yang terlibat.	Timbangan analitik (gram)	Pada penelitian ini mencit diberi pakan tempe pada kelompok obesitas sebanyak 2gram/hari dan 4gram/hari. Tempe diberikan selama 28 hari.	Numerik
2	Glukosa darah	Pada penelitian ini Gula darah yang dimaksud adalah Gula darah puasa (GDP) yang diketahui dari pemeriksaan darah mencit yang di ambil pada hari pertama sebelum perlakuan dan di hari ke-29 setelah perlakuan dimana sebelumnya mencit telah dipuaskan terlebih dahulu selama 8 jam.	Glukometer	Nilai : mg/dl	Numerik
3	Mencit Obesitas	Pada penelitian ini mencit Obesitas adalah mencit yang telah di beri perlakuan dengan pemberian pakan tinggi lemak tinggi protein selama 28 hari.	Timbangan	Kategori 20-30 gram = normal 31-40 gram = obesitas	Kategorik

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Alur Penelitian

Penelitian ini merupakan uji eksperimental dalam bidang ilmu Biokimia-Biologi Molekuler dan ilmu Patologi Klinik. Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian tempe pada mencit jantan obesitas. Mencit dipilih secara acak. Mencit dibagi atas 4

kelompok besar yang terdiri dari 5 mencit jantan tiap kelompoknya. Sehingga total keseluruhan melibatkan 20 ekor mencit jantan. Pada penelitian ini terdiri atas kelompok kontrol normal (K1), kontrol obesitas (K2), kelompok pemberian tempe 2 gram/hari (KP1) dan kelompok pemberian tempe 4 gram/hari.

Mencit diadaptasi di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selama 7 hari. Setiap kelompok dipelihara pada lokasi dan waktu yang sama serta kondisi yang sesuai. Untuk kelompok kontrol diberi pakan standar BR-2 dan minum. Kemudian kelompok kontrol 2 diberi pakan standar BR-2 dengan kombinasi makanan tinggi lemak dan protein serta minum. Sedangkan untuk kelompok perlakuan dikombinasikan dengan tempe. Untuk kelompok perlakuan 1 (KP1) diberikan tempe sebanyak 2 gram/hari, dan kelompok perlakuan 2 (KP2) diberikan tempe sebanyak 4 gram/hari. Dihari ke-1 mencit dipuasakan terlebih dahulu selama 8 jam kemudian sampel darah diambil dari ujung ekor yang dilukai dan ditempelkan pada strip *Glucometer Accu-chek*. Setelah beberapa detik angka kadar glukosa darah akan muncul pada alat tersebut. Pada hari ke-29 mencit juga dipuasakan selama 8 jam kemudian sampel darah kembali diambil melalui vena cauda dibagian ekor mencit melalui perlukaan dan ditempelkan pada strip *Glucometer Accu-chek*.

Pengukuran kadar gula darah puasa dilakukan dilaboratorium Biologi-Biokimia Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Hasil penelitian berupa data dan ditabulasi untuk mengetahui pengaruh pemberian tempe terhadap kadar glukosa darah puasa mencit jantan galur ddY obesitas.

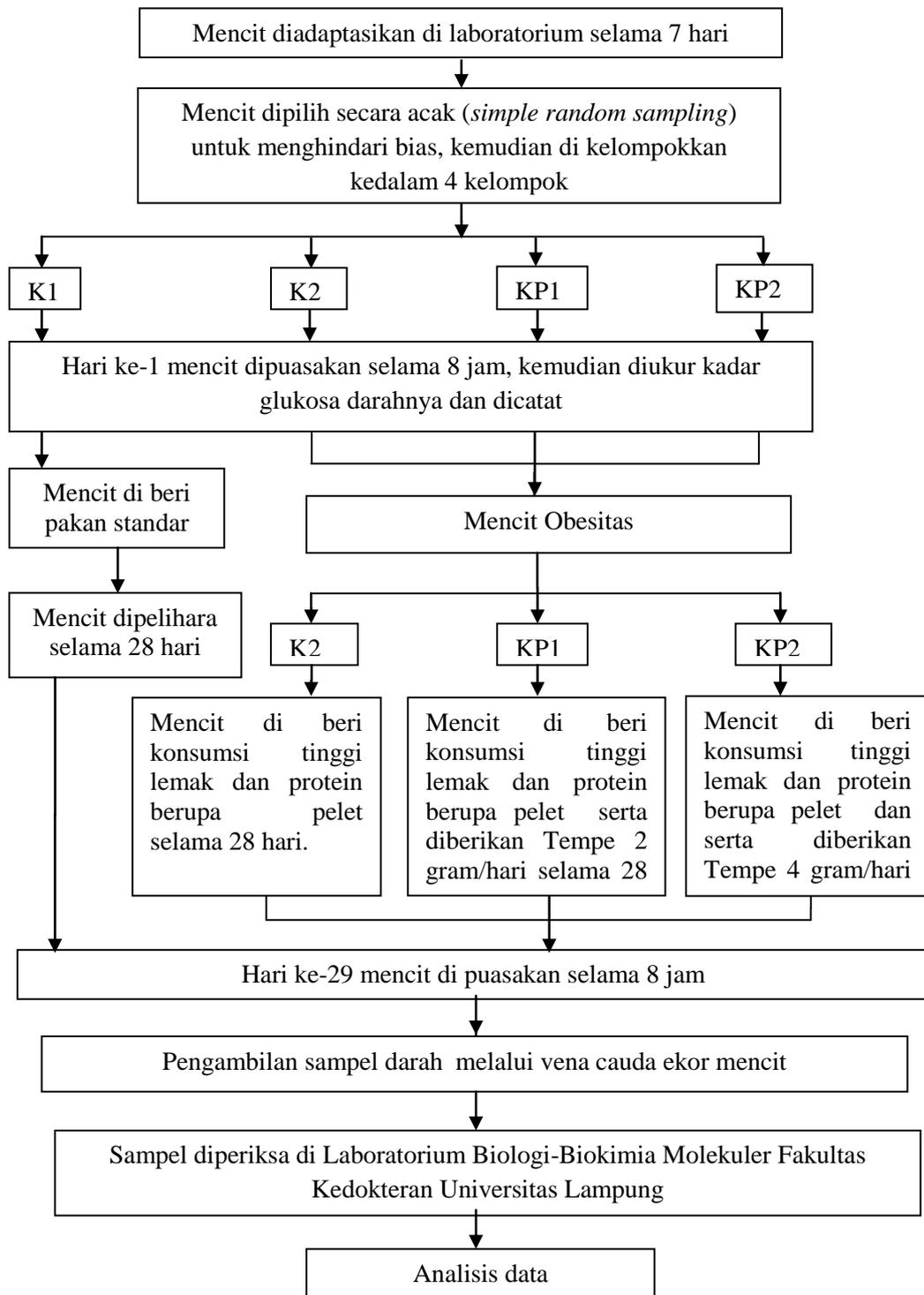
3.6.2. Prosedur Pemberian Tempe

Berdasarkan data dari *Guidelines for the Housing Of Mice In Scientific Institutions* 2012. Konsumsi pakan mencit berkisar dari 4-8 gram/hari dan konsumsi air 5-8 ml/hari. (Fawcett, 2012). Pakan tempe diberikan dengan dosis 2 gram/hari pada KP1 dan 4 gram/hari pada KP2. Tempe diberikan satu kali pada pagi hari dengan meletakkan pada tempat makan mencit dan dipastikan agar habis ketika siang hari setelah itu mencit tetap diberikan pakan tinggi lemak tinggi protein untuk mencit obesitas dan pakan standar untuk mencit normal.

3.6.3. Prosedur Pengambilan Darah Mencit

Mencit dimasukkan kedalam wadah seperti tabung dengan bagian kepala ditutupi jaring dan bagian belakang ditutup dengan penghalang tanpa menutupi ekor. Kemudian bersihkan ekor mencit menggunakan kasa steril. Setelah itu ekor mencit di gunting menggunakan gunting yang telah disterilkan. Darah yang keluar kemudian didekatkan dengan strip glukometer kemudian di baca hasilnya lalu di catat.

3.7. Diagram Alur Penelitian



Gambar 15. Diagram Alur Penelitian

Keterangan :

K1 = Kelompok kontrol normal

K2 = Kelompok kontrol obesitas

KP1 = Kelompok perlakuan pemberian pakan tempe 2 gram/hari

KP2 = Kelompok Perlakuan pemberian pakan tempe 4 gram/hari.

3.8. Rancangan Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini diproses dengan program SPSS Version 21.0.0.0 *for windows 64 bit*, dengan prosedur sebagai berikut :

3.8.1. Uji Normalitas Data ($p > 0,05$)

Pengujian normalitas data menggunakan *Shapiro Wilk test* untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak normal karena populasi < 50 . Hasil uji normalitas ini untuk menentukan analisis data berikutnya, yaitu analisis parametrik bila data berdistribusi normal atau non parametrik apabila data tidak berdistribusi normal.

3.8.2. Uji Homogenitas Data ($p > 0,05$)

Pengujian homogenitas data menggunakan *Levene test* untuk mengetahui data homogen atau tidak homogen. Hasil uji homogenitas ini untuk menentukan analisis berikutnya, yaitu analisis parametrik untuk data homogen normal atau non parametrik apabila data tidak homogen.

3.8.3. Uji Parametrik (*Dependent t-test*)

Untuk menguji pengaruh kelompok kontrol normal (K1), kelompok kontrol obesitas (K2), kelompok pemberian tempe 2 gram/hari (KP1) dan kelompok pemberian tempe 4 gram/hari (KP2) sebelum dan 28 hari setelah perlakuan. Apabila distribusi data tidak normal maka digunakan uji alternatif berupa uji *Wilcoxon*. Hipotesis dianggap bermakna bila $p < 0,05$.

3.8.4. Uji Parametrik (*One way- Anova*)

Dilakukan untuk menguji perbedaan pengaruh kelompok kontrol 1 (K1), kelompok kontrol 2 (K2), kelompok perlakuan (KP1) dan kelompok perlakuan 2 (KP2) terhadap glukosa darah mencit obesitas yang diberi tempe. Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, digunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*. Hipotesis dianggap bermakna bila $p < 0,05$. Jika pada uji *One way-Anova* atau *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-Hoc LSD* untuk melihat perbedaan antar kelompok.

3.9. Etika Penelitian

Penelitian ini telah diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu sebagai berikut :

1. *Replacement*

Adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.

2. *Reduction*

Adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap dapat mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer yaitu $t(n-1) \geq 15$, Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok.

3. *Refinement*

Adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi, yaitu sebagai berikut.

- a. Bebas dari rasa lapar dan haus, dalam penelitian ini hewan coba diberikan pakan dan minum standar secara *ad libitum*.
- b. Bebas dari ketidaknyamanan, dalam penelitian ini hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 5 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya, sehingga dapat mengurangi stres pada hewan coba.

- c. Bebas dari nyeri dan penyakit. Dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan coba jika diperlukan.

Prosedur perlakuan dan pengambilan sampel selama penelitian telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan prinsip etika penelitian hewan coba. Hal ini dilakukan untuk menghargai kehidupan hewan coba sesuai dengan etika penelitian yang berlaku. (Ridwan, 2013).

Pada penelitian ini peneliti telah mengajukan surat permohonan lolos etika penelitian kepada tim etik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.