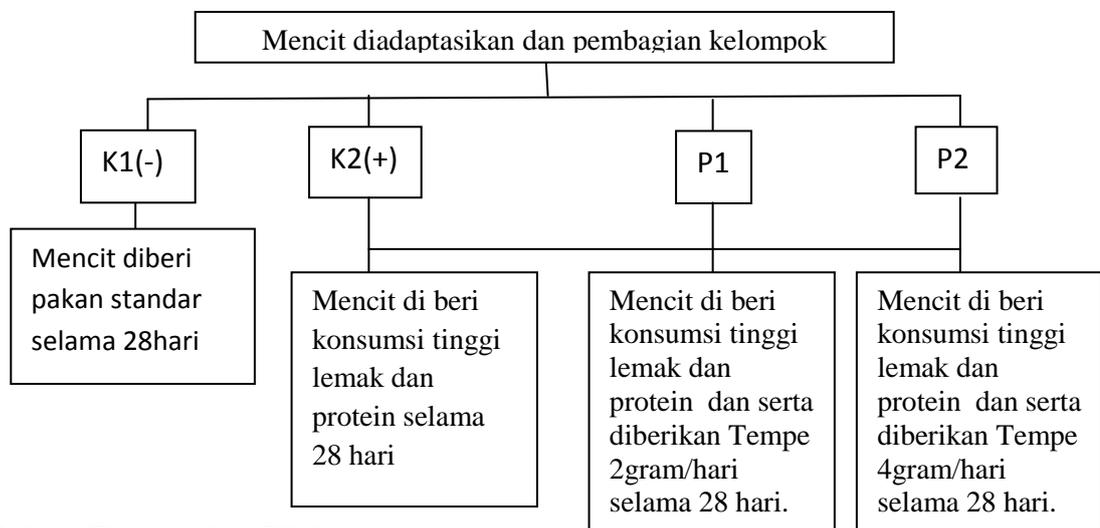


### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *post-test control design group only*. Penelitian menggunakan mencit jantan obesitas yang dibagi atas 4 kelompok. Terdiri atas 1 kelompok kontrol negatif (-), 1 kelompok kontrol positif (+), 1 kelompok obesitas yang diberikan tempe 2gram/hari selama 28 hari (P1), dan 1 kelompok obesitas yang diberikan tempe 4gram/hari selama 28 hari (P2).



#### 3.2 Tempat dan Waktu

##### 3.2.1 Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

### 3.2.2 Waktu

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Agustus sampai bulan November 2015.

## 3.3 Populasi dan Sampel

### 3.3.1 Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus L*) berusia 6-8 minggu dengan berat badan rata-rata mencit kontrol 20-30 gram dan berat badan rata-rata mencit obesitas adalah 40-60 gram. Mencit diperoleh dari Institut Pertanian Bogor (IPB). Sampel penelitian adalah bagian dari populasi yang mempunyai kriteria inklusi dan eksklusi.

#### a. Kriteria inklusi mencit normal:

- 1) Mencit jantan galur DDY
- 2) Berumur 6-8 minggu
- 3) Berat badan rata-rata 20-30 gram
- 4) Diperoleh dari tempat pembiakan yang sama
- 5) Dipelihara pada tempat dan waktu yang sama

#### b. Kriteria inklusi mencit obesitas

- 1) Mencit jantan obesitas galur DDY
- 2) Berumur 6-8 minggu
- 3) Berat badan rata-rata 40-60 gram
- 4) Diperoleh dari tempat pembiakan yang sama
- 5) Diperoleh pada tempat dan waktu yang sama

**c. Kriteria eksklusi**

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

**3.3.2 Sampel**

Penentuan besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus Frederer. Menurut Frederer (1967), 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 pengulangan atau 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 jumlah sampel yang akan digunakan pada tiap kelompok adalah lima ekor mencit jantan dan mencit dikalikan dengan empat perlakuan sehingga

jumlah sampel adalah 20 ekor mencit. Dua puluh ekor mencit dibagi menjadi empat kelompok secara acak. Pembagian empat kelompok mencit, yaitu :

Kelompok K(-) : 5 mencit (kontrol)

Kelompok K(+) : 5 mencit (obesitas)

Kelompok P1 : 5 mencit (perlakuan)

Kelompok P2 : 5 mencit (perlakuan)

Dan untuk menghindari drop out atau mencit mati maka setiap kelompok diberi tambahan dengan rumusan sebagai berikut (Victorya, 2015).

$$N = \frac{n}{1-f}$$

Keterangan :

N = besar sampel koreksi.

n = besar sampel awal.

f = perkiraan proporsi drop out sebesar 10%

Dari rumusan tersebut sehingga perhitungannya adalah sebagai berikut.

$$N = \frac{n}{(1-f)}$$

$$N = \frac{5}{(1-10\%)}$$

$$N = \frac{5}{(1-0,1)}$$

$$N = \frac{5}{0,9}$$

$$N = 5,55$$

$$N = 6 \text{ (hasil pembulatan ke atas)}$$

Jadi, jumlah sampel yang diperlukan untuk setiap kelompok adalah 6 ekor dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 4 kelompok sehingga pada penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus dari populasi yang ada.

### **3.4 Alat dan Bahan**

#### **3.4.1 Alat**

- a. Timbangan mencit
- b. Kandang mencit
- c. Tempat makan mencit
- d. Botol minuman
- e. Alat bedah minor
- f. Objek glass
- g. Mikroskop
- h. Cover Glass
- i. *Improved Neubauer*

#### **3.4.2 Bahan**

- a. Mencit jantan obesitas usia 6-8 minggu
- b. Tempe
- c. Pakan standar (pelet dan gabah)
- d. Pakan tinggi protein dan lemak (paka TPL)
- e. Larutan anestesi ketamine
- f. Larutan NaCl 0,9%

### 3.5 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

#### 3.5.1 Identifikasi Variabel

- a. Variabel perlakuan adalah pemberian tempe
- b. Variabel respon pada penelitian ini adalah perubahan jumlah dan motilitas sperma pada mencit jantan obesitas.

#### 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 4. Definisi Operasional Variabel

| Variabel                    | Definisi Operasional   | Alat Ukur | Cara Ukur   | Hasil Ukur | Skala Ukur |
|-----------------------------|--|-----------|---|------------|------------|
| Obesitas                    | Obesitas adalah peningkatan lemak tubuh yang berlebihan. Obesitas disebabkan karena ketidak seimbangan antara asupan energi dengan pengeluaran energi, sehingga energi yang berlebih disimpan dalam bentuk jaringan lemak. | Timbangan | Mencit diberi pakan TLTP sampai obesitas selama 30 hari lalu ditimbang. Berat badan mencit obesitas 40-60 gram. | Gram       | Numerik    |
| Pemberian tempe pada mencit | Tempe yang digunakan dalam penelitian ini adalah tempe kedelai kuning. Tempe diperoleh dari rumah pak ibrahim.   | Timbangan | Mencit diberi pakan tempe pada P1= 2gr/hr pada P2= 4gr/hr   | Gram       | Numerik    |

|                       |  |  |   |                          |         |
|-----------------------|--|--|---|--------------------------|---------|
| Jumlah spermatozoa    | Jumlah spermatozoa yang diperoleh dan dihitung didalam kamar A, B, C, atau D hemositometer <i>Improved Neubauer</i> dengan pembesaran 100x dan kemudian hasilnya dimasukan ke dalam rumus perhitungan spermatozoa/ml<br>$\text{Jumlah sperma} \times \text{pengenceran} \times 200.000 \text{ juta/ml.}$ (gandasoebrata).                      | Improv<br>ved<br>Neuba<br>uver,<br>mikros<br>kop | Hewan<br>dibedah<br>kemudian<br>testisnya<br>dikeluarkan,<br>dilakukan<br>pemotongan<br>pada cauda<br>epididimis<br>kemudian<br>dipencet dan<br>dikeluarkan<br>isinya lalu<br>dihomogenkan<br>dengan NaCl<br>0,9% | Jumla<br>h: jt<br>sel/ml | Numerik |
| Motilitas spermatozoa | Motilitas sperma mencit yang dinilai adalah sperma yang dapat bergerak maju kedepan dan disesuaikan dengan kriteria klasifikasi motilitas spermatozoa yang terdapat dalam lapang pandang yang diperiksa. Persentase rata-rata motilitas sperma normal adalah 32,67%. Dikatakan tidak bagus apabila <32,67%.<br>( Rahmanisa, 2013 Wasito, 2008) | Kriteri<br>a<br>klasifi<br>kasi<br>motilit<br>as | A : Berjalan<br>cepat dan lurus<br>B : Berjalan<br>lambat<br>C: Bergerak di<br>tempat<br>D : Tidak<br>bergerak sama<br>sekali.  | Motilit<br>as: %         | Ordinal |

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Alur Penelitian

Penelitian ini merupakan uji eksperimental laboratorium dalam bidang ilmu Biologi-Biokimia Molekuler. Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian tempe pada mencit jantan obesitas. Mencit dibagi atas 4 kelompok besar yang terdiri dari 5 mencit jantan tiap kelompoknya, serta 1 cadangan untuk

setiap kelompok. Sehingga total keseluruhan melibatkan 24 ekor mencit jantan. Pada penelitian ini terdiri atas kelompok kontrol 1 (K1) yaitu mencit normal, kontrol 2 (K2) yaitu mencit obesitas, dan kelompok perlakuan 1 dan 2 (KP 1,2) yang merupakan mencit jantan obesitas yang diberikan tempe.

Mencit diadaptasi di laboratorium 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 28 mencit dibedah kemudian testisnya dikeluarkan lalu dilakukan pemotongan pada cauda epididimis kemudian cauda epididimis dipencet dan dikeluarkan isinya, lalu diletakkan diatas cawan petri yang sudah ditetesi NaCl 0,9% sebanyak 3 tetes. Sampel dihomogen lalu diambil sebanyak 15 µl dan diletakkan diajak glass objek dan ditutupi dengan cover glass. Dilakukan pengamatan motilitas sperma dengan pembesaran 40x lalu dilihat dari 4-6 lapang pandang sampai 100 spermatozoa, lalu klasifikasikan sesuai dengan kriteria yang sudah ada. Lalu sampel yang dihomogenkan diambil sebanyak 20 µl kemudian ditambah lagi NaCl 0,9% sebanyak 380 µl. Lalu ambil 15 µl dari sampel yang telah dicampur dan diletakkan pada kamar *improved neubauer*. Dilakukan pengamat dengan mikroskop pembesaran 100x dan diawali pada kamar A, B, C dan D.

Pengukuran jumlah dan motilitas sperma mencit jantan obesitas dilakukan dilaboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Hasil penelitian berupa data dan ditabulasi untuk mengetahui pengaruh pemberian tempe kedelai kuning pada jumlah dan motilitas mencit obesitas.

### **3.6.2 Prosedur Pemberian Tempe**

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Priastiti (2013) tempe diberikan sebanyak 150 gram perhari pada manusia sehingga menimbulkan efek hipokolesterolemik. Dikonversikan ke mencit menjadi 1,5 gram. Sehingga dosis yang diberikan untuk kelompok perlakuan 1 adalah 2 gram/hari dan kelompok perlakuan 2 adalah 4 gram/hari.

### **3.6.3 Prosedur Pengamatan jumlah dan motilitas Sperma Mencit**

Setelah mencit diterminasi, dilakukan pengamatan sebagai berikut:

#### **a. Jumlah spermatozoa**

Spermatozoa yang telah diperoleh terlebih dahulu dihomogenkan dengan NaCl 0,9%, selanjutnya diambil 10  $\mu$ l sampel dan dimasukkan kedalam kotak-kotak hemositometer *Improved Neubauer* serta ditutup dengan kaca penutup. Diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100x, hemositometer diletakan dan dihitung jumlah spermatozoa pada kotak atau bidang A, B, C, atau D. Hasil perhitungan jumlah spermatozoa kemudian dimasukkan kedalam rumus penentuan jumlah spermatozoa/ml suspensi sekresi kauda epididimis sebagai berikut: (Gandasoebrata, 2007).

$$\text{Jumlah spermatozoa} \times \text{pengenceran} \times 200.000 \text{ juta/ml}$$

Dimana n = jumlah spermatozoa yang dihitung pada kotak A, B, C , atau D

### **b. Motilitas spermatozoa**

Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan metode partodiharjo (Rahmanisa, 2013). Untuk menentukan motilitas spermatozoa, diambil spermatozoa dari kedua epididimis seperti penjelasan diatas kurang lebih 10-15  $\mu$ l keatas glass objek lalu ditutup dengan kaca penutup. Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan menghitung presentase spermatozoa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100x, dihitung yang pergerakannya progresif maju kedepan dibandingkan dengan seluruh teramati (bergerak dan tidak bergerak) kemudian dikali dengan 100% (Gandasoebrata, 2007).

$$\% \text{ motilitas} = \frac{\text{jumlah spermatozoa bergerak}}{\text{Total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Pengamatan dilakukan pada lima lapangan pandang dengan kriteria motilitas sebagai berikut :

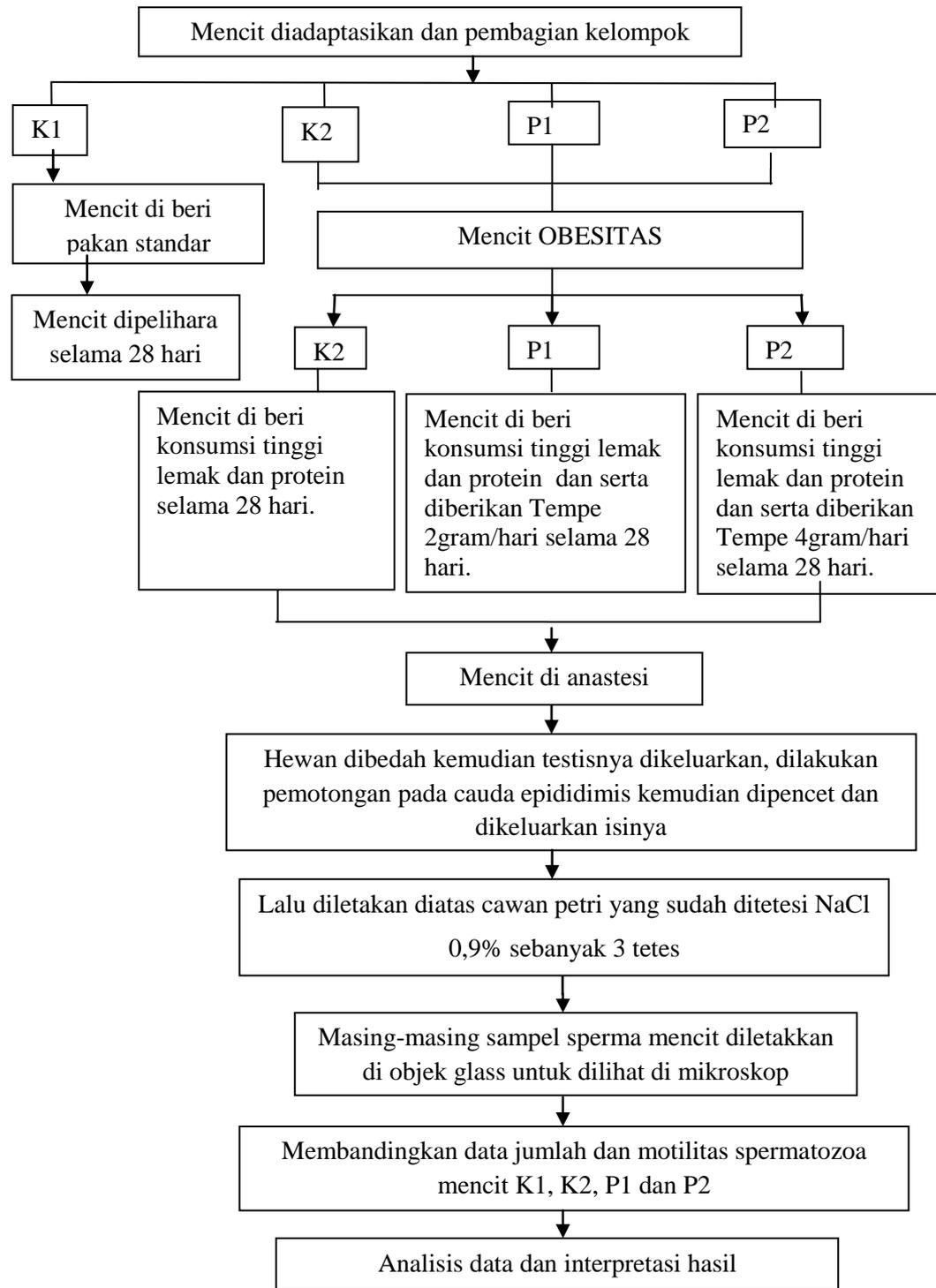
A : Berjalan cepat dan lurus

B : Berjalan lambat

C : Bergerak di tempat

D : Tidak bergerak sama sekali

Biasanya empat sampai enam lapang pandang diperiksa untuk memperoleh seratus spermatozoa secara berurutan yang kemudian diklasifikasi sehingga menghasilkan presentase setiap katagori motilitas (Wasito, 2008).



Gambar 5. Diagram Alur Penelitian

Keterangan :

K1 = Kelompok Kontrol 1

K2 = Kelompok Kontrol 2

### **3.7 Rancangan dan Analisis Data**

#### **3.7.1 Rancangan Analisis Data**

Analisis data pada penelitian ini diproses dengan program SPSS Version 21.0.0.0 *for windows 64 bit*. Dengan tingkat signifikansi  $p < 0,05$ , dengan prosedur sebagai berikut :

#### **3.7.2 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.

#### **3.7.3 Uji Homogenitas Data ( $p > 0,05$ )**

Pengujian homogenitas data menggunakan *Leven's* untuk mengetahui data homogen atau tidak homogen. Hasil uji homogenitas ini untuk menentukan analisis berikutnya, yaitu analisis parametrik bila data berdistribusi normal atau non parametrik apabila data tidak berdistribusi normal.

#### **3.7.4 Uji Parametri (*Dependent t-test*)**

Untuk menguji pengaruh perlakuan pada kelompok kontrol 1 (K1), kelompok kontrol 2 (K2), dan kelompok perlakuan (KP) terhadap jumlah dan motilitas sperma mencit obesitas yang diberi tempe.

### 3.7.5 Uji Parametrik (*One way- Anova*)

Dilakukan untuk menguji perbedaan pengaruh kelompok kontrol 1 (K1), kelompok kontrol 2 (K2), dan kelompok perlakuan (KP) terhadap jumlah dan motilitas sperma mencit obesitas yang diberi tempe. Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, digunakan uji nonparametrik *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.

### 3.8 Etika Penelitian

Penelitian ini telah diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan No. 2356/UN26/8/DT/2015 yang telah disetujui oleh dr. Agustyas Tjiptaningrum, Sp. PK sebagai Ketua Etik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.