

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *post-test control design group*. Penelitian ini menggunakan mencit jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok. Terdiri atas 1 kelompok kontrol normal, 1 kelompok kontrol obesitas, dan 2 kelompok mencit obesitas yang diberikan tempe yaitu kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2. Penelitian ini untuk mengetahui perubahan kadar fraksi lemak darah mencit obesitas yang diberikan tempe.

#### **3.2. Tempat dan Waktu**

##### **3.2.1. Tempat**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia-Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk memberikan perlakuan dan pemeliharaan pada mencit.

### 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 6-14 minggu dengan berat badan rata-rata 30-100 gram.

### 3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini mencit jantan. Sesuai dengan rumus Frederer. Menurut Frederer (1967), rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah:

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

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

$$4(5-1) \leq 15$$

$$4n-4 \leq 15$$

$$4n \leq 19$$

$$n \leq 4,75$$

Sampel yang akan digunakan pada tiap kelompok adalah 5 ekor mencit jantan ( $n = 4,75$ ). Jadi, jumlah sampel yang diperlukan untuk setiap kelompok adalah 5 ekor dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 4

kelompok sehingga pada penelitian ini menggunakan 20 ekor mencit dari populasi yang ada.

Kriteria inklusi mencit normal:

- 1) Mencit jantan galur DDY
- 2) Berumur 6-14 minggu
- 3) Berat badan rata-rata 20-30 gram
- 4) Diperoleh dari tempat pembiakan yang sama
- 5) Dipelihara pada tempat dan waktu yang sama

Kriteria inklusi mencit obesitas

- 1) Mencit jantan obesitas galur DDY
- 2) Berumur 6-14 minggu
- 3) Berat badan rata-rata 30 -100 gram
- 4) Diperoleh dari tempat pembiakan yang sama
- 5) Diperoleh pada tempat dan waktu yang sama

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

### **3.4 Alat dan Bahan**

#### **3.4.1 Alat**

- a. Timbangan mencit, timbangan analitik
- b. Pipet mikro
- c. Alat tulis
- d. Tik Biru, Kuning, dan Putih
- e. Microtube
- f. Spektrofotometer

#### **3.4.2 Bahan**

- a. Tempe
- b. Pakan standar (pelet dan gabah)
- c. Pakan tinggi protein dan lemak
- d. Aguades
- e. Reagen

### **3.5 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel**

#### **3.5.1 Identifikasi Variabel**

- a. Variabel perlakuan adalah pemberian tempe dengan dosis 2 gram/hari dan 4 gram/hari.
- b. Variabel respon pada penelitian ini adalah perubahan kadar fraksi lemak darah mencit jantan.

### 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	Alat Ukur	Hasil Ukur	Jenis Variabel
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. Tempe diperoleh dari rumah pak Ibrahim.	Timbangan (gr)	Pada penelitian ini mencit diberi pakan tempe sebanyak 2 gram/hari dan 4 gram/hari (Konversi 150 gram perhari pada manusia). Tempe diberikan selama 28 hari.	Numerik
Fraksi Lemak Darah (Trigliserida, Kolesterol total, Kolesterol LDL, dan Kolesterol HDL)	Pada penelitian ini fraksi lemak darah diketahui dari pemeriksaan darah mencit. Darah diambil dari jantung mencit melalui pembedahan.	Klasifikasi (mg/dl)	Kolesterol Total Diinginkan 200-239 Mg/Dl Kolesterol LDL Diinginkan 130-159 Mg/Dl Kolesterol HDL Diinginkan >60 Mg/Dl Trigliserida diinginkan 150-199 mg/dl	Numerik

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Alur Penelitian

Penelitian ini merupakan uji eksperimental laboratorium dalam bidang ilmu Biokimia-Biologi Molekuler dan ilmu Patologi Klinik. 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 2 cadangan untuk setiap kelompok. Sehingga total keseluruhan melibatkan 28 ekor mencit jantan. Hal ini berdasarkan perhitungan seksama dengan menggunakan rumus Frederer, sehingga hal ini mampu untuk memenuhi prinsip *Replacement* dan *Reduction* dalam etika penelitian yang diajukan. 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. Supaya mencit merasa nyaman peneliti tetap memperhatikan temperatur *Animal house* yang terjaga pada suhu 20-25C. Kematian mencit atau mencit yang mengalami cacat akibat perkelahian dihindari dengan menempatkan 1 ekor mencit dalam tiap kandang, sehingga mencit akan tetap merasa aman dan nyaman dari ancaman. 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-29 mencit dipuasakan terlebih dahulu selama 10 jam kemudian dinarkosis menggunakan ketamine + xylazine dengan dosis 75-100 mg/kgbb dan 5-10 mg/kgbb secara intraperitoneal. Hal ini akan menjadikan mencit bebas dari rasa nyeri saat dilakukan prosedur pengambilan darah. Kemudian mencit di-*euthanasia* dengan menggunakan metode *cervical dislocation* dengan cara ibu jari dan jari telunjuk ditempatkan dikedua sisi leher ditekan ke dasar tengkorak dan tangan lainnya pada pangkal ekor atau kaki belakang dengan cepat ditarik sehingga menyebabkan pemisahan antara tulang leher dan tengkorak (AVMA, 2013).

Setelah mencit dipastikan mati, darah diambil melalui jantung dengan menggunakan spuit 1 ml sebanyak 2 ml. Kemudian langsung dimasukan ke dalam *vacutainer SST (yellow top)* yang sudah berisi *Clot activator* dan *Inner separator*. Kemudian darah sebanyak 2 ml didiamkan terlebih dahulu selama 30 menit. Selanjutnya disentrifugasi menggunakan *sentrifuge* dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang terbentuk dipisahkan dari endapan sel-sel darah dengan menggunakan pipet (Bahaudin,2008).

Pengukuran kadar fraksi lemak darah dilakukan dilaboratorium Biologi-Biokimia Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Hasil

penelitian berupa data dan ditabulasi untuk mengetahui pengaruh pemberian tempe kedelai kuning pada fraksi lemak darah mencit obesitas.

### **3.6.2 Prosedur Pemberian Tempe**

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Priastiti (2013) tempe diberikan sebanyak 150 gram per hari sehingga menimbulkan efek hipokolesterolemik. Dikonversikan ke mencit menjadi 1,5 gram. Sehingga digunakan dosis sebesar 2 gram/hari dan 4 gram/hari selama 28 hari pemberian. Kelompok yang diberikan tempe adalah kelompok perlakuan 1 dan 2.

### **3.6.3 Prosedur Pengambilan Darah Mencit**

Darah mencit untuk pemeriksaan fraksi lemak darah diambil melalui jantung dengan menggunakan spuit 1 ml sebanyak 2 ml. Metode pemeriksaan: Enzymatic Colorimetric 62, 63, 64.

### **3.6.4 Penentuan Kadar Fraksi Lemak Darah**

#### **a. Pengukuran kadar kolesterol total**

Sampel dan reagen dicampur dan dimasukkan ke dalam inkubator 20-25C selama 20 menit. Absorbansinya diukur pada spektrofotometer dengan 500 nm dengan menggunakan larutan blanko sebagai titik 0 nya. Perhitungan konsentrasi kolesterol total dengan rumus: Kolesterol total = absorbansi/absorbansi standar x standar mg/dl atau mmol/l.

b. Pengukuran kadar Trigliserida

Serum dan larutan pereaksi dicampurkan dan diinkubasi pada suhu 20C – 25C selama 20 menit. Absorbansi diukur sampai (As) dan absorbansi standar (Ast) dengan spektrofotometer 500 nm. Perhitungan kadar trigliserida dengan menggunakan rumus :Konsentrasi trigliserida = Absorbansi x (standar)/absorbansi standar mg/l atau Batas Kelarutan = 100 mg/dl atau 11,4 mmol/l.

c. Pengukuran kadar LDL

Konsentrasi kolesterol LDL dihitung dari kadar kolesterol total, HDL, dan trigliserida menurut rumus Fried & Wald:

$$\text{LDL} = \text{Kolesterol total} - \text{HDL} - \text{Trigliserida}/5 \text{ mg/dl}$$

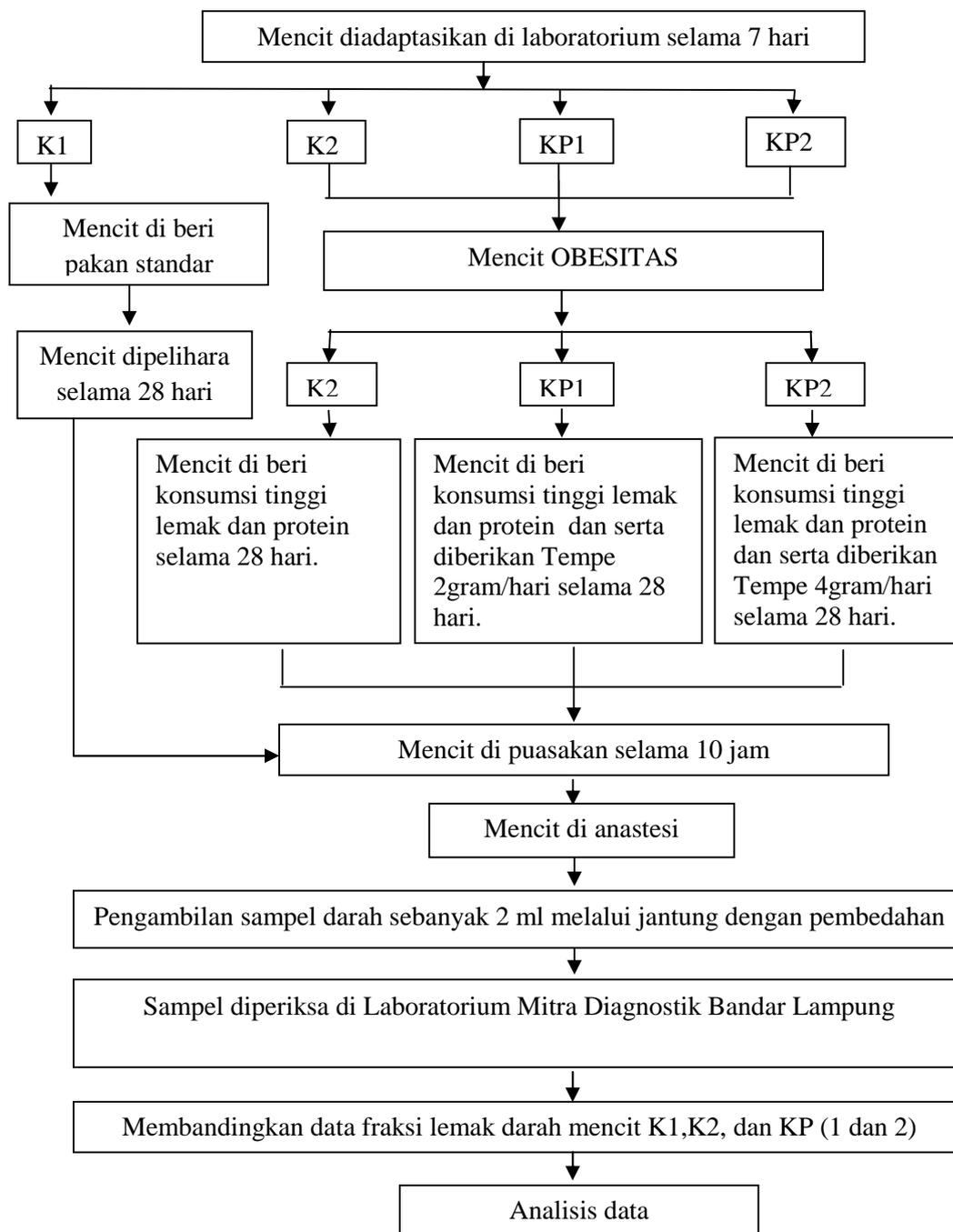
$$\text{LDL} = \text{Kolesterol total} - \text{HDL} - \text{Trigliserida}/2.2 \text{ mmol/l.}$$

d. Pengukuran kadar HDL

Serum sebanyak 200 µl ditambah 500 µl reagen presipitan dimasukan ke dalam sentrifuge. Dicampurkan merata, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 20 menit. Supernatan digunakan untuk pemeriksaan kadar kolesterol HDL. Pengukuran kadar kolesterol HDL yaitu supernatan dan pereaksi kolesterol dicampur homogen. Kemudian didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang. Atau pada suhu 37C selama 5 menit. Kemudian dibaca pada 500 nm dengan titik nol blanko. Dengan rumus perhitungan:

$$\text{Kadar kolesterol HDL} = \text{Absorbansi}/\text{Absorbansi standar} \times (\text{standar}).$$

### 3.7 Diagram Alur Penelitian



Gambar 5. Diagram Alur Penelitian

Keterangan :

K1 = Kelompok Kontrol 1

K2 = Kelompok Kontrol 2

KP = Kelompok Perlakuan

### 3.8 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini diproses dengan menggunakan program statistik untuk komputer. Dengan tingkat signifikansi  $p < 0,05$ , 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 *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.

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

pengujian parametrik dilakukan untuk menguji perbedaan pengaruh kelompok kontrol 1 (K1), kelompok kontrol 2 (K2), dan kelompok perlakuan (KP) terhadap fraksi lemak darah 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.

### **3.9 Ethical Clearance**

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

#### *1. Replacement*

*Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan yang telah diperhitungkan dengan seksama, baik itu berdasarkan pengalaman terdahulu maupun literatur yang ada untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel maupun biakan jaringan.

#### *2. Reduction*

*Reduction* adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian dengan populasi sesedikit mungkin, akan tetapi tetap dapat mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer yakni  $t(n-1) = 15$ , dimana  $t$  merupakan jumlah kelompok percobaan dan  $n$  merupakan jumlah dari pengulangan atau jumlah sampel pada tiap kelompok.

#### *3. Refinement*

*Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi dengan menerapkan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi, yaitu sebagai berikut:

- a. Bebas dari rasa lapar maupun haus, dalam penelitian ini hewan coba diberikan pakan dan minum standar secara *ad libitum*.
- b. Bebas dari rasa tidak nyaman, dalam penelitian ini hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba dibagi menjadi 1 ekor tiap kandang. *Animal house* berada cukup jauh dari gangguan bising serta aktivitas manusia. Kandang dijaga selalu kebersihannya, sehingga mampu mengurangi stres pada hewan coba.
- c. Bebas dari nyeri dan penyakit. Dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan coba apabila diperlukan. Pada penelitian ini hewan coba diberikan perlakuan khusus dengan keharusan memakan tempe 2 gr/hari dan tempe 4 gr/hari. Dimana apabila tempe tersebut tidak dihabiskan, maka prosedur penggunaan sonde lambung untuk memberikan makan pada hewan coba tersebut akan dilakukan agar hewan coba benar-benar memakan tempe sesuai dosis yang ada.

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