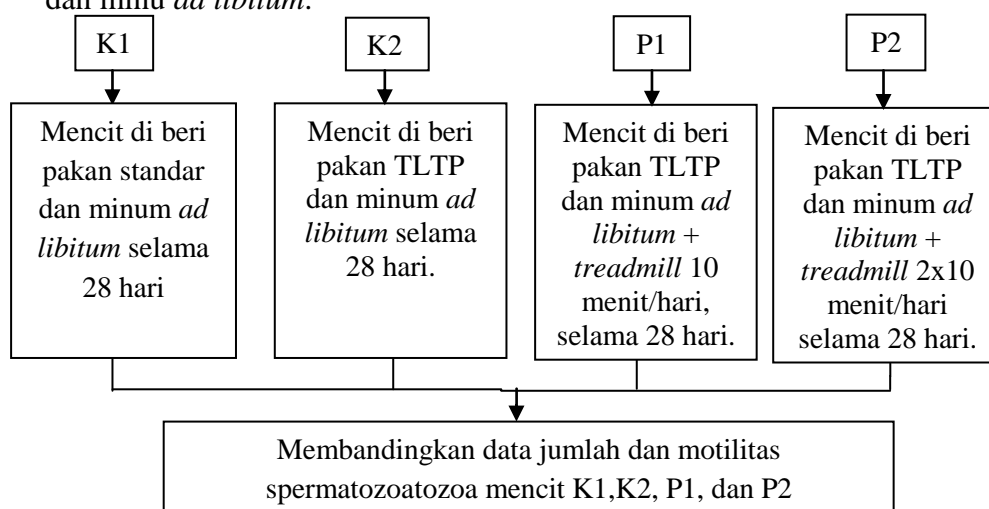


### III. METODE PENELITIAN

#### III.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. Penelitian ini menggunakan *post-test control design group only*. Penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol normal (K1), kelompok kontrol obesitas (K2), kelompok perlakuan (P1) mencit obesitas + perlakuan *treadmill* 1 kali sehari selama 10 menit, dan kelompok perlakuan (P2) mencit obesitas + perlakuan *treadmill* 2 kali sehari masing-masing 10 menit. K1 diberi pakan standar dan minum *ad libitum*, sedangkan K2, K3, dan K4 diberi pakan tinggi lemak tinggi protein (TLTP) dan minum *ad libitum*.



**Gambar 7.** Desain Penelitian

## **III.2 Tempat dan Waktu**

### **III.2.1 Tempat**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk perlakuan *treadmill* dan Laboratorium Biologi-Biokimia Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk menguji kualitas spermatozoa mencit yang terdiri dari jumlah dan motilitas spermatozoa mencit.

### **III.2.2 Waktu**

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan September sampai bulan November 2015.

## **III.3 Populasi dan Sampel**

### **III.3.1 Populasi**

Populasi dari penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus* L.) berusia 6-8 minggu dengan berat badan rata-rata mencit normal adalah 20-30 gram, sedangkan berat badan rata-rata mencit obesitas adalah 30-60 gram yang diperoleh di Institut Pertanian Bogor (IPB).

### III.3.2 Sampel

Sampel penelitian adalah bagian dari populasi yang mempunyai kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan. Penentuan besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus Frederer. Menurut Frederer (1967), rumus penentuan besar ulangan 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 K1 : 5 mencit (kontrol)

Kelompok K2 : 5 mencit (obesitas)

Kelompok P1 : 5 mencit (perlakuan 1x10 per hari)

Kelompok P2 : 5 mencit (perlakuan 2x10 per hari)

Dan untuk menghindari *drop out* atau mencit mati maka setiap kelompok diberi tambahan dengan rumusan sebagai berikut :

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

Keterangan :

N = besar sampel koreksi.

n = besar sampel awal.

f = perkiraan proporsi *drop out* sebesar 10% (Victorya, 2015)

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.

a. **Kriteria inklusi mencit kontrol (normal):**

- 1) Mencit jantan galur DDY
- 2) Berumur 6-8 minggu
- 3) Berat badan normal 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 obesitas rata-rata 30-60 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

### III.4 Alat dan Bahan

#### III.4.1 Alat

- a. Kandang mencit
- b. Tempat makan dan minum mencit
- c. Timbangan mencit, timbangan analitik
- d. Alat *treadmill* mencit
- e. Kapas
- f. Alat bedah minor
- g. *Sterof foam*, pelapis plastik, jarum pentul/paku kecil
- h. Kaca arloji
- i. Preparat apusan (*Deck glass*)
- j. *Object glass*
- k. Mikroskop
- l. *Improved Neubauer*
- m. *Logbook* dan alat tulis

#### III.4.2 Bahan

- a. Mencit jantan usia 6-8 minggu
- b. Pakan standar (pelet dan gabah)
- c. Pakan tinggi lemak dan protein (TLP)
- d. Eter/klorofil
- e. Larutan anestesi *ketamine*
- f. Larutan NaCl 0,9%

### **III.5 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel**

#### **III.5.1 Identifikasi Variabel**

- a. Variabel perlakuan adalah pemberian perlakuan *treadmill*
- b. Variabel respon pada penelitian ini adalah kualitas yang terdiri dari jumlah dan motilitas spermatozoa mencit

#### **III.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 sebagai berikut:

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
<b>Perlakuan Treadmill pada mencit</b>	Aktivitas fisik (menggunakan alat) yang dilakukan untuk memberi perlakuan kepada hewan coba agar bisa berlari di atasnya tanpa berhenti dengan waktu yang telah peneliti tetapkan.	<i>Treadmill</i>	Lari	Numerik	menit
<b>Jumlah Spermatozoa</b>	Konsentrasi spermatozoa yang ada dalam pengamatan (diukur dalam sampel yang diambil)	<i>Improved Neubauer, mikroskop</i>	Hitung jumlah	Numerik	Juta/sel
<b>Motilitas Spermatozoa</b>	Spermatozoa yang dapat bergerak maju kedepan dan bergerak di tempat serta disesuaikan dengan kriteria klasifikasi motilitas spermatozoa yang terdapat dalam lapang pandang yang diperiksa.	Kriteria klasifikasi motilitas, mikroskop	Menilai kriteria	Ordinal	Persen (%)
<b>Mencit Obesitas</b>	Mencit yang dibuat obesitas dengan diberi makan tinggi lemak dan tinggi protein selama satu bulan.	Timbangan	Ditimbang	Numerik	Gram (gr)

**Tabel 1.** Definisi Operasional Variabel



## III.6 Prosedur Penelitian

### III.6.1 Alur Penelitian

Penelitian ini merupakan uji eksperimental laboratorium dalam bidang ilmu Fisiologi dan Biologi-Biokimia Molekuler. Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan *treadmill* terhadap perubahan jumlah dan motilitas spermatozoa mencit obesitas. Mencit dibagi atas 4 kelompok besar yang terdiri dari 6 mencit jantan tiap kelompoknya, dengan total mencit jantan yang digunakan adalah sebanyak 24 ekor. Kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah kelompok kontrol normal (K1) yaitu mencit dengan berat badan normal, kontrol positif (K2) yaitu mencit obesitas, dan kelompok perlakuan 1 (P1) yaitu mencit obesitas yang diberi perlakuan *treadmill* 10 menit sehari sekali selama 28 hari, perlakuan 2 (P2) yaitu mencit obesitas yang diberi perlakuan *treadmill* 10 menit sehari dua kali selama 28 hari.

Sebelum dilakukan penelitian, mencit diadaptasi di laboratorium selama 7 hari. Suhu kandang dijaga sekitar 25°C dan ada pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam.

- Kelompok K1 diberi pakan standar BR-2 dan minum *ad libitum* selama 28 hari.
- Kelompok K2 diberi pakan tinggi lemak dan protein serta minum *ad libitum* selama 28 hari.
- Kelompok P1 diberi makanan tinggi lemak dan protein serta minum *ad libitum* dan diberi perlakuan *treadmill* 10 menit sehari sekali selama 28 hari.
- Kelompok P2 diberi pakan tinggi lemak dan protein serta minum *ad libitum* dan diberi perlakuan *treadmill* 10 menit sehari dua kali selama 28 hari.

Pada hari ke-29 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 dihomogenkan lalu diambil sebanyak 15  $\mu$ l dan diletakkan di atas glass objek dan ditutupi dengan cover glass. Dilakukan pengamatan motilitas spermatozoa dengan pembesaran 40x lalu dilihat dari 4-6 lapang pandang, lalu klasifikasikan sesuai dengan kriteria yang sudah ada. Lalu sampel yang dihomogenkan diambil sebanyak 20  $\mu$ l kemudian ditambah lagi NaCl 0,9% sebanyak 90  $\mu$ l. Lalu ambil 15  $\mu$ l dari sampai 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 spermatozoa mencit jantan obesitas dilakukan dilaboratorium Biologi-Biokimia Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Hasil penelitian berupa data dan ditabulasi untuk mengetahui pengaruh perlakuan *treadmill* terhadap jumlah dan motilitas mencit obesitas.

### **III.6.2 Prosedur Pemberian Perlakuan *Treadmill***

Pada penelitian ini digunakan alat *treadmill* khusus yang disambungkan dengan listrik. Setelah alat *treadmill* dihidupkan, mencit diletakkan di atasnya dan dibiarkan berlari selama 10 menit untuk satu kali pemberian perlakuan pada kelompok P1 dan selama 10 menit sehari 2 kali untuk kelompok P2

### **III.6.3 Prosedur Pengamatan jumlah dan motilitas Spermatozoa Mencit**

Setelah mencit diterminasi, dilakukan pengamatan sebagai berikut:

**a. Jumlah spermatozoa**

Suspensi 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):

$$\text{Jumlah spermatozoa} = n \times \text{pengenceran} \times 200.000 \text{ (juta/ml)}$$

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% (Rahmanisa, 2013):

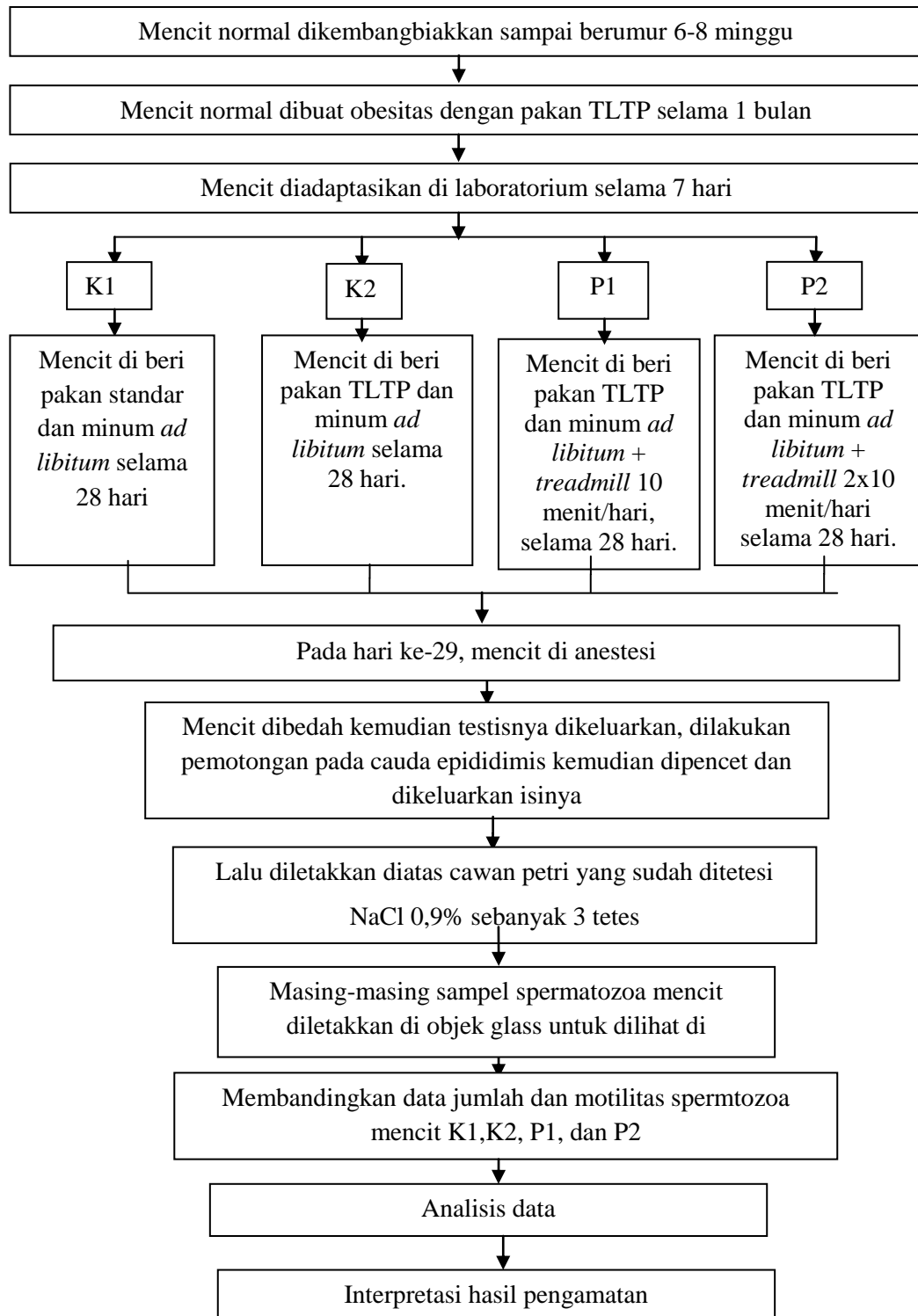
$$\% \text{ motilitas} = \frac{\text{jumlah spermatozoa progresif}}{\text{total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

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

Data yang diambil adalah spermatozoa yang kualitasnya bagus yaitu dengan kriteria bergerak dan tidak bergerak.

## ALUR PENELITIAN



Gambar 8. Alur Penelitian

Keterangan :

K1 = Kelompok Kontrol Normal

K2 = Kelompok Kontrol Obesitas

P1 = Kelompok Perlakuan *Treadmill* 1x10 menit/hari

P2 = Kelompok Perlakuan *Treadmill* 2x10 menit/hari

Pakan TLTP = Pakan Tinggi Lemak Tinggi Protein

### **III.7 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 :

#### **III.7.1 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.

### III.7.2 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.

### III.7.3 Uji Parametrik (*One way- Anova*)

Dilakukan untuk menguji perbedaan pengaruh kelompok kontrol 1 (K1), kelompok kontrol 2 (K2), dan kelompok perlakuan (P1 & P2) terhadap jumlah spermatozoa mencit obesitas yang diberi perlakuan *treadmill*. 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.



### III.8 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 ketidak-nyamanan, dalam penelitian ini hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian

hewan coba terbagi menjadi 4-8 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, pada penelitian hewan coba diberikan perlakuan dengan menggunakan *nasogastric tube* dilakukan dengan mengurangi rasa nyeri sesedikit mungkin, dosis perlakuan diberikan berdasarkan pengalaman terdahulu maupun literatur yang telah ada.

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).