

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimental laboratorium menggunakan *post-test control design group only*. Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok penelitian, yaitu kelompok kontrol normal (K), kelompok kontrol obesitas (KP), kelompok perlakuan (P1) menci obesitas + perlakuan treadmill 1 kali sehari selama 10 menit, dan kelompok perlakuan (P2) menci obesitas + perlakuan treadmill 2 kali sehari masing-masing 10 menit.

3.2 Tempat dan Waktu

3.2.1 Tempat

Perlakuan treadmill dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung sedangkan untuk pemeriksaan profil lipid dilakukan di Laboratorium Biokimia Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan Laboratorium Klinik Mitra Diagnostik Bandar 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 jantan (*Mus musculus l.*) berusia 6-8 minggu dengan berat badan rata-rata mencit normal adalah 20-30 gram, dan berat badan rata-rata mencit obesitas adalah lebih dari 30 gram.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan adalah mencit jantan. Besar sample ditentukan berdasarkan rumus Federer. Rumus penentuan besar sampel untuk uji eksperimental rancangan acak lengkap (RAL) adalah:

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

Dimana t merupakan jumlah kelompok penelitian dan n merupakan jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini terdapat 4 kelompok penelitian sehingga didapat perhitungan sampel sebagai berikut:

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

$$4n-4 \leq 15$$

$$4n \leq 19$$

$$n \leq 4,75$$

Berdasarkan hasil perhitungan didapat jumlah sampel yang akan digunakan pada tiap kelompok adalah 5 ekor mencit jantan (pembulatan $n = 4,75$). Jumlah sampel yang akan digunakan dalam penelitian adalah 20 ekor mencit jantan.

a. **Kriteria inklusi mencit normal:**

- 1) Mencit jantan
- 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
- 2) Berumur 6-8 minggu
- 3) Berat badan rata-rata >30 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

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

- a. Kandang mencit
- b. Tempat makan dan minum mencit
- c. Timbangan mencit, timbangan analitik
- d. Logbook dan alat tulis
- e. *Automatic Biochemistry Analyser (Kenza 240 TX)*
- f. Alat treadmill (listrik)
- g. Micropipet
- h. Spuit 1 cc
- i. Flacon
- j. Tip
- k. *Vacutainer*

3.4.2 Bahan

- a. Mencit jantan usia 6-8 minggu
- b. Pakan Tinggi Lemak Protein (TLP)
- c. Pakan standar
- d. Larutan anestesi ketaminexylazine
- e. Reagen HDL-Cholesterol REF 90206 *direct method*
- f. Reagen LDL-Cholesterol REF 90416 *direct method*
- g. Reagen Cholesterol REF 80106 *CHOD-PAP method*

- h. Reagen Trigliserida REF 80019 GPO *method*

3.5 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.5.1 Identifikasi Variabel

- a. Variabel bebas (*independent variable*) dalam penelitian ini adalah pemberian perlakuan treadmill dan diet tinggi lemak dan protein kepada mencit jantan (*Mus musculus l.*).
- b. Variabel terikat (*dependent variable*) Pada penelitian ini adalah profil lipid darah (fraksi lemak total, Trigliserida, HDL, LDL) mencit jantan (*Mus musculus l.*).

3.5.2 Definisi Operasional Variabel

Pada tabel 1 dilampirkan definisi konsep dan operasional untuk memudahkan penjelasan dan memperlihatkan variabel-variabel yang terlibat dalam penelitian ini:

No.	Variabel	Definisi	Hasil Ukur	Jenis Variabel
1.	Treadmill	Treadmill adalah alat olahraga listrik yang digunakan untuk berlari memiliki Panjang 40 cm. Treadmill yang digunakan dalam	0= tidak dilakukan treadmill 1 = 1 x 10 menit 2= 2 x 10 menit	Nominal

Lanjutan tabel 4

penelitian ini adalah treadmill yang berukuran kecil dan disambungkan ke listrik, untuk memberi perlakuan kepada hewan coba agar bisa berlari di atasnya tanpa berhenti dengan kecepatan 20 meter per menit dan waktu yang telah peneliti tetapkan.
Kelompok perlakuan P1 dilakukan treadmill selama 10 menit sehari sekali selama 28 hari, dan P2 dilakukan treadmill selama

Lanjutan tabel 4

		10 menit 2 kali sehari selama 28 hari.		
2.	Profil Lipid	Metode yang dilakukan untuk evaluasi berupa fraksi lemak total, HDL, LDL dan trigliserida.	yang	Kadar dalam Numerik plasma (mg/dL)
4.	Mencit Obesitas	Mencit <i>Mus musculus</i> jantan galur DDY dengan berat badan lebih dari 30 gram	<i>Mus</i>	gram

Tabel 4. Definisi Operasional Variabel

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Alur Penelitian

Penelitian ini adalah uji eksperimental laboratorium dalam bidang ilmu Biologi-Biokimia Molekuler dan Patologi Klinik. Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan treadmill terhadap profil lipid mencit obesitas. Mencit dibagi atas 4 kelompok besar yang terdiri dari 7 mencit jantan tiap kelompoknya, dengan total mencit jantan yang digunakan adalah sebanyak 28 ekor. Kelompok

perlakuan dalam penelitian ini adalah kelompok kontrol normal (K) yaitu mencit dengan berat badan normal, kontrol positif (KP) yaitu mencit obesitas, dan kelompok perlakuan 1 (P1) yaitu mencit obesitas yang diberi perlakuan treadmill selama 10 menit sehari sekali selama 28 hari, perlakuan 2 (P2) yaitu mencit obesitas yang diberi perlakuan treadmill selama 10 menit sehari 2 kali selama 28 hari.

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

- Kelompok K diberi pakan standar dan minum *ad libitum* selama 28 hari.
- Kelompok KP diberi pakan dengan kombinasi makanan tinggi lemak dan protein serta minum *ad libitum* selama 28 hari.
- Kelompok P1 diberi pakan dengan kombinasi makanan tinggi lemak dan protein serta minum *ad libitum* dan diberi perlakuan treadmill selama 10 menit sehari sekali selama 28 hari.
- Kelompok P2 diberi pakan dengan kombinasi makanan tinggi lemak dan protein serta minum *ad libitum* dan diberi perlakuan treadmill selama 10 menit sehari dua kali selama 28 hari.

Pada hari ke-29 mencit dipuasakan dahulu selama 10 jam, kemudian dilakukan terminasi pada mencit lalu dilakukan *cardiac puncture* untuk pemeriksaan profil lipid.

3.6.2 Prosedur Pemberian Perilaku Treadmill

Pada penelitian ini digunakan alat treadmill khusus yang disambungkan dengan listrik dan memiliki panjang lintasan 40cm. 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.

3.6.3 Prosedur Pengambilan darah mencit

Prosedur pengambilan darah mencit diawali dengan prosedur terminasi. Mencit diberikan obat anestesi Ketaminexylazine 75-100 mg/kg + 5-10 mg/kg secara IP. Kemudian tikus di *euthanasia* menggunakan metode *cervical dislocation* (Leary et al. 2013). Setelah tikus dipastikan mati, dilakukan bedah kemudian dilakukan *cardiac puncture* dan diambil organ jantung.

Darah mencit diambil menggunakan *sput* sebanyak 1cc menggunakan metode *cardiac puncture*. Darah dimasukkan ke dalam *vacutainer*. Komponen darah yang digunakan untuk pemeriksaan profil lipid adalah komponen serum.

3.6.3 Prosedur Penentuan Profil Lipid

Darah mencit terlebih dahulu dibuat dalam bentuk serum dengan melakukan sentrifugasi Pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Setelah sentrifugasi selesai, serum akan terbentuk berupa warna bening pada bagian atas. Serum akan digunakan dalam analisis profil lipid yang meliputi kolesterol total, trigliserida, HDL, dan LDL. Pada pemeriksaan ini akuades digunakan sebagai larutan blanko.

Analisis kolesterol dilakukan melalui metode CHOD-PAP dengan pengambilan 10 μ L serum darah ditambahkan 1 ml reagen. Larutan blanko menggunakan akuades sebanyak 10 μ L lalu ditambahkan 1 ml reagen. Larutan standar dipersiapkan sebanyak 10 μ L dan ditambhkan 1 ml reagen. Selanjutnya serum, larutan blanko dan larutan standar yang telah diberi reagen dimasukkan ke dalam alat untuk dilakukan pemeriksaan fotometri pada absorbansi 500nm.

Analisis trigliserida dilakukan melalui metode GPO dengan pengambilan 10 μ L serum darah ditambahkan 1 ml reagen. Larutan blanko menggunakan akuades sebanyak 10 μ L lalu ditambahkan 1 ml reagen. Larutan standar dipersiapkan sebanyak 10 μ L dan ditambhkan 1 ml reagen. Selanjutnya serum, larutan blanko dan

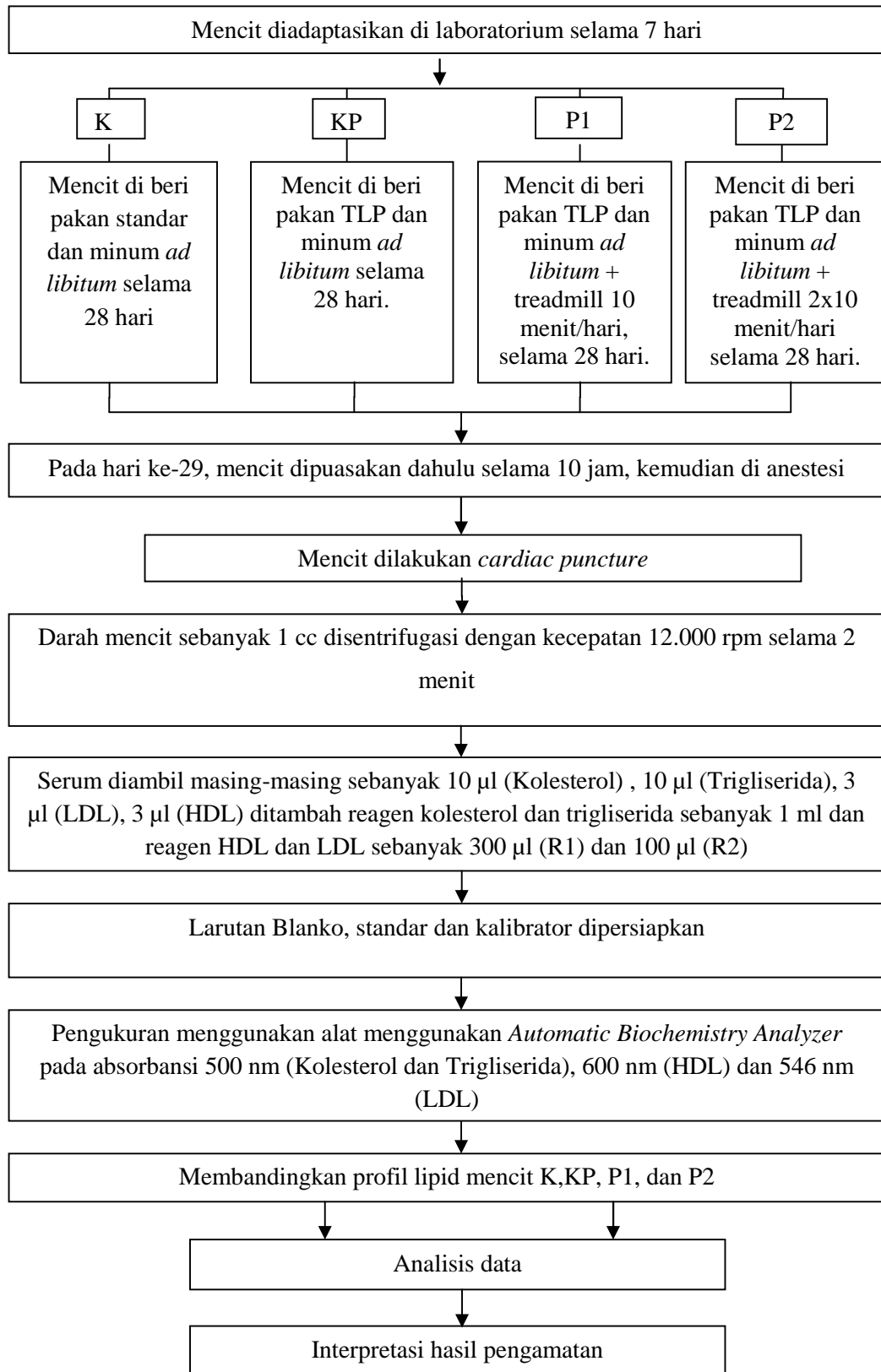
larutan standar yang telah diberi reagen dimasukkan ke dalam alat untuk dilakukan pemeriksaan fotometri pada absorbansi 500nm

Analisis HDL dilakukan melalui metode *direct* melalui dua tahap pemeriksaan fotometri. Pertama, serum sebanyak 3 μL ditambahkan 300 μL reagen R1 (*accelerator*). Larutan calibrator disiapkan menggunakan reagen kalibrator CK-MB sebanyak 3 μL dan dicampur dengan 300 μL reagen R1. Larutan blanko dipersiapkan dengan mengambil 300 μ reagen R1. Masing-masing larutan yang telah dicampur dengan reagen dimasukkan ke dalam alat pada pemeriksaan absorbansi 600nm. Setelah itu, masing-masing larutan blanko, kalibartor dan serum ditambahkan 100 μL reagen R2 (*selective detergent*) dan kembali diperiksa pada absorbansi 600 nm.

Analisis LDL dilakukan melalui metode *direct* melalui dua tahap pemeriksaan fotometri. Pertama, serum sebanyak 3 μL ditambahkan 300 μL reagen R1 (*reagent enzymes*). Larutan calibrator disiapkan menggunakan reagen kalibrator CK-MB sebanyak 3 μL dan dicampur dengan 300 μL reagen R1. Larutan blanko dipersiapkan dengan mengambil 300 μ reagen R1. Masing-masing larutan yang telah dicampur dengan reagen dimasukkan ke dalam alat pada pemeriksaan absorbansi 546 nm. Setelah itu, masing-masing larutan blanko, kalibartor dan serum ditambahkan

100 μ L reagen R2 (*selective detergent*) dan kembali diperiksa pada absorbansi 546 nm.

ALUR PENELITIAN



Bagan 3. Alur Penelitian

Keterangan :

K = Kelompok Kontrol Normal (Tidak Obesitas, Tidak Treadmill)

KP = Kelompok Kontrol Obesitas (Obesitas, Tidak Treadmill)

P1 = Obesitas, Kelompok Perlakuan Treadmill 10 menit/hari

P2 = Obesitas, Kelompok Perlakuan Treadmill 2 x 10 menit/hari

Pakan TLP = Pakan Tinggi Lemak dan Protein

3.7 Rancangan Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini diproses pada program statistik dengan menggunakan tingkat signifikansi $p < 0,05$. Prosedur pengolahan data yang dilakukan adalah sebagai berikut :

3.7.1 Uji Normalitas Data ($p > 0,05$)

Pengujian normalitas data menggunakan *Shapiro Wilk test* untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak normal karena jumlah populasi yang digunakan < 50 . Selanjutnya digunakan analisis parametrik bila data berdistribusi normal. Jika data berdistribusi tidak normal, tetapi homogen, atau berdistribusi normal tetapi tidak homogen, maka dilakukan transformasi data. Jika hasil transformasi data didapatkan data normal dan homogen, maka dilakukan analisis parametrik. Apabila hasil transformasi data masih berdistribusi tidak normal, homogen, atau berdistribusi normal, tidak homogen, maka dilakukan analisis non parametrik *Kruskal Wallis*.

3.7.2 Uji Homogenitas Data ($p > 0,05$)

Uji *Leven's* digunakan 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.

3.7.3 Uji Parametri (Dependent t-test)

Uji parametri dependent T-Test dilakukan untuk menguji pengaruh perlakuan pada kelompok kontrol (K), kelompok kontrol obesitas (KP), dan kelompok perlakuan (P1 dan P2) terhadap profil lipid dan gambaran histopatologi arteri koronaria mencit obesitas yang diberi perlakuan treadmill

3.7.3 Uji Parametrik (*One way- Anova*)

Uji parametrik (*One way-Anova*) dilakukan untuk menguji perbedaan pengaruh kelompok kontrol 1 (K), kelompok kontrol 2 (KP), dan kelompok perlakuan (P1 dan P2) terhadap profil lipid dan gambaran histopatologi mencit obesitas yang diberi perlakuan treadmill. Uji non Parametrik *Kruskal-Wallis* digunakan apabila data tidak memenuhi syarat uji parametrik. 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 pengaruh antar kelompok.

3.8 *Dummy Table*

3.8.1 Pengaruh perlakuan treadmill terhadap kadar kolesterol total

Kelompok Perlakuan	Rerata Kadar Kolesterol total (mg/dL)	(P)
K		
KP		
P1		
P2		

3.8.2 Pengaruh perlakuan treadmill terhadap kadar trigliserida

Kelompok Perlakuan	Rerata kadar trigliserida (mg/dL)	(P)
K		
KP		
P1		
P2		

3.8.3 Pengaruh perlakuan treadmill terhadap kadar HDL

Kelompok Perlakuan	Rerata Kadar HDL(mg/dL)	(P)
K		
KP		
P1		
P2		

3.8.4 Pengaruh perlakuan treadmill terhadap kadar LDL

Kelompok Perlakuan	Rerata Kadar LDL(mg/dL)	(P)
K		
KP		
P1		
P2		

3.9 Ethical Clearance

Surat persetujuan etik penelitian akan disampaikan kepada komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung agar mendapat persetujuan dan lulus syarat etik penelitian.