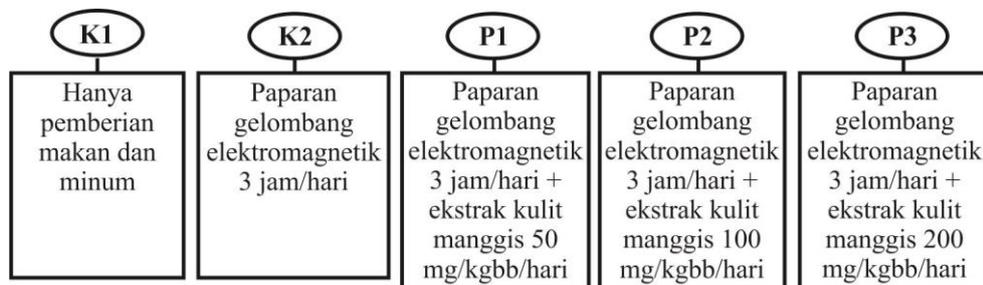


### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dan menggunakan rancangan acak lengkap dengan *Posttest Only Control Group Design*. Dalam penelitian ini dilakukan randomisasi, artinya pengelompokan anggota-anggota kelompok kontrol dan eksperimen dilakukan berdasarkan acak atau random. Kelompok-kelompok tersebut dianggap sama sebelum dilakukan perlakuan. Dengan rancangan ini, memungkinkan peneliti mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2012).

Penelitian ini menggunakan tikus jantan yang dibagi dalam 5 kelompok. Terdiri dari kelompok kontrol satu (K1), kontrol dua (K2), perlakuan satu (P1), perlakuan dua (P2), dan perlakuan tiga (P3).



Gambar 10. Gambaran kelompok

## **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

### **3.2.1 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus-Desember 2015.

### **3.2.2 Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di *Animal House*, Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Biomolekular Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

## **3.3 Populasi dan Sampel**

### **3.3.1 Populasi Penelitian**

Menurut Sastroasmoro (1995) Populasi adalah setiap subyek (dapat berupa manusia, binatang percobaan, data laboratorium dan lain-lain) yang memenuhi karakteristik yang ditentukan. Dalam penelitian ini populasi yang dimaksud adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 10-12 minggu dengan berat badan sekitar 200-300 gram yang diperoleh dari Palembang Tikus Center (PTC).

### **3.3.2 Sampel Penelitian**

Dalam penelitian ini sampel yang digunakan sebanyak 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang dipilih secara randomisasi

atau acak. Kemudian tikus-tikus tersebut dibagi ke dalam 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali, sesuai dengan rumus Frederer.

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

Keterangan :

$n$  = jumlah ulangan setiap kelompok.

$t$  = banyaknya perlakuan.

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok uji, sehingga banyaknya ulangan adalah sebagai berikut.

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

$$5 (n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

$$n = 4$$

Jadi, banyaknya ulangan setiap kelompok percobaan adalah 4 ekor. Namun, jumlah ini harus diolah untuk diperhitungkan kembali agar dapat mengantisipasi hilangnya unit eksperimen, dengan rumusan sebagai berikut.

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

Keterangan :

$N$  = besar sampel koreksi.

$n$  = jumlah pengulangan.

$f$  = perkiraan proporsi drop out sebesar 10%.

(Yana, E. 2014).

Dari rumusan tersebut sehingga perhitungannya adalah sebagai berikut.

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

$$N = \frac{4}{(1-10\%)}$$

$$N = \frac{4}{(1-0,1)}$$

$$N = \frac{4}{0,9}$$

$$N = 4,44$$

$$N = 5 \text{ (hasil pembulatan ke atas)}$$

Jadi, jumlah sampel yang diperlukan untuk setiap kelompok adalah 5 ekor dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 5 kelompok sehingga pada penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus dari populasi yang ada.

### 3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

#### 3.4.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*.
- b. Berada pada rentang usia 10-12 minggu.
- c. Memiliki berat sekitar 200-300 gram.
- d. Dalam kondisi sehat.

### 3.4.2 Kriteria Eksklusi

- a. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.
- b. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak, keluar cairan atau eksudat yang tidak normal dari mata, hidung, mulut, anus atau genital, serta perubahan aktivitas menjadi tidak aktif).

## 3.5 Alat dan Bahan

### 3.5.1 Alat Penelitian

- a. Spuit 1cc dan sonde lambung, untuk pemberian ekstrak pada tikus.
- b. Timbangan elektronik, untuk menimbang berat badan tikus.
- c. Alat untuk pemeriksaan spermatozoa (pinset, bilik hitung *improved neubauer*, pipet *eppendorf*, kaca arloji, *object glass*, *deck glass*).
- d. Mikroskop.
- e. *Minor set*, untuk melakukan pembedahan tikus.
- f. *Handscoen*, Kapas, dan alkohol.
- g. *Handphone* dan *stopwatch*.
- h. Kandang modifikasi (fiber), sebagai wadah untuk pemaparan radiasi.
- i. Kandang hewan, serta tempat makan dan minum hewan.

### **3.5.2 Bahan Penelitian**

- a. Hewan coba yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*.
- b. Bahan pakan hewan berupa pelet.
- c. Kulit buah manggis.
- d. Larutan etanol 40%, ketamine, dan NaCl 0,9%.

## **3.6 Prosedur Penelitian**

### **3.6.1 Ethical Clearance**

Penelitian ini dimulai dengan pengajuan proposal *ethical clearance* untuk mendapatkan izin etik penelitian menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan galur *Sprague dawley*. Proposal diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

### **3.6.2 Pengadaan Hewan Coba**

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* sebanyak 25 ekor yang diperoleh dari Palembang Tikus Center (PTC).

### 3.6.3 Adaptasi Tikus

Sebelum memulai perlakuan, tikus terlebih dahulu diadaptasi selama 7 hari dan diukur berat badannya. Selama masa adaptasi dan masa perlakuan, tikus diberi makan serta minuman air *ad libitum*.

### 3.6.4 Pembagian Kelompok

**Tabel 2.** Pembagian kelompok perlakuan

<b>Kelompok</b>	<b>Perlakuan</b>
Kelompok K1	Kelompok kontrol satu, tanpa perlakuan paparan gelombang elektromagnetik <i>handphone</i> dan tanpa pemberian ekstrak etanol kulit manggis
Kelompok K2	Kelompok kontrol dua, dengan perlakuan paparan gelombang elektromagnetik <i>handphone</i> selama 3 jam / hari selama 28 hari, tanpa pemberian ekstrak etanol kulit manggis
Kelompok P1	Kelompok perlakuan satu, dengan pemberian paparan gelombang elektromagnetik <i>handphone</i> selama 3 jam / hari dan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 50 mg/kgbb/hari selama 28 hari
Kelompok P2	Kelompok perlakuan dua, dengan pemberian paparan gelombang elektromagnetik <i>handphone</i> selama 3 jam / hari dan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 100 mg/kgbb/hari selama 28 hari
Kelompok P3	Kelompok perlakuan tiga, dengan pemberian paparan gelombang elektromagnetik <i>handphone</i> selama 3 jam / hari dan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 200 mg/kgbb/hari selama 28 hari

### 3.6.5 Prosedur Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis

#### 1. Determinasi buah manggis.

Sebelum pembuatan ekstrak, terlebih dahulu dilakukan determinasi terhadap buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) yang digunakan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Kebun Raya Bogor dengan surat keterangan nomor 4738/IPH.3./KS/IX/2015 (terlampir).

2. Pembuatan ekstrak etanol kulit manggis.

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) yang sudah dilepaskan dari daging buah dan kulit luar yang keras, kemudian diekstrak dengan menggunakan pelarut etanol 40%.

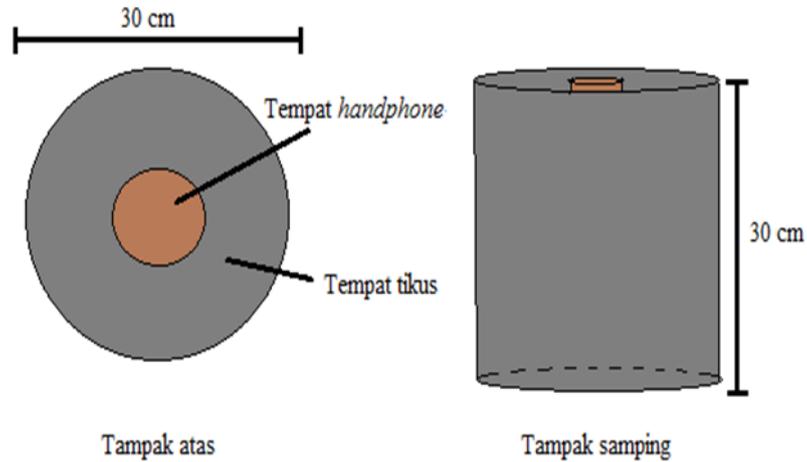
3. Pemberian ekstrak etanol kulit manggis dilakukan selama 28 hari dan 30 menit sebelum dilakukan induksi gelombang elektromagnetik *handphone*.

(Dyahnugra & Widjanarko, 2015).

### **3.6.6 Perlakuan Paparan Gelombang Elektromagnetik *Handphone***

Paparan gelombang elektromagnetik menggunakan *handphone*. Paparan gelombang elektromagnetik *handphone* dilakukan dengan cara meletakkan *handphone* dalam keadaan menyala di tiap kandang tikus yang telah dimodifikasi khusus untuk paparan. Kandang modifikasi merupakan kandang yang digunakan selama paparan gelombang elektromagnetik *handphone* yang berbentuk tabung dengan tinggi 30 cm dan diameter 30 cm, dan pada bagian tengah kandang tersebut dibuat sebuah lubang untuk tempat meletakkan *handphone* yang digunakan sebagai sumber gelombang elektromagnetik. Sebelum paparan, hewan coba dipindahkan dari kandang pemeliharaan ke kandang modifikasi sesuai dengan kelompoknya. *Handphone* tersebut lalu diaktifkan dan dibiarkan dalam keadaan *talk mode* selama 3 jam/hari pada kelompok K2, P1, P2, P3 (Victorya, 2015).

Paparan tersebut dilakukan setiap malam selama 28 hari, 30 menit setelah hewan diberikan ekstrak kulit manggis.



**Gambar 11.** Sketsa kandang tikus modifikasi untuk paparan (Victorya, 2015).

### 3.6.7 Prosedur Terminasi Hewan Coba

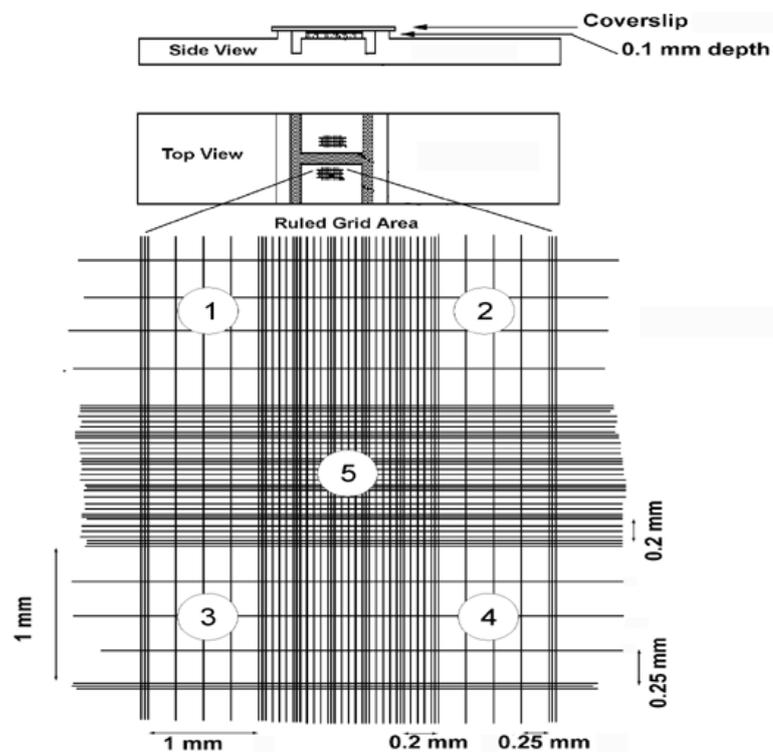
Terminasi tikus dilakukan setelah perlakuan terakhir, tikus diterminasi dengan anastesi terlebih dahulu menggunakan ketamine dosis 75-100mg/kg secara intraperitoneal, kemudian di euthanasia dengan metode cervical dislocation. Kemudian, subjek penelitian dilakukan pembedahan guna mengambil sampel spermatozoa dari kauda epididimis untuk diamati.

### 3.6.8 Prosedur Pengamatan Jumlah dan Motilitas Spermatozoa

#### a. Jumlah spermatozoa

Menghitung jumlah spermatozoa dilakukan dengan bilik hitung *improved neubauer* dari pipet leukosit, sedangkan aquadest dapan

dipakai selaku cairan pengencer. Isilah pipet dengan suspensi sperma yang telah dihomogenkan terlebih dahulu, selanjutnya diambil sebanyak 10 $\mu$ l sampel dan dimasukkan ke dalam kotak-kotak hemositometer *improved Neubauer* serta ditutup dengan kaca penutup. Di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali, hitunglah spermatozoa dalam kamar hitung pada permukaan seluas 1 mm<sup>2</sup>, kemudian angka yang telah didapat dikalikan dengan 200.000 untuk mendapatkan hasil spermatozoa/ml (Gandasoebrata, 1967).



**Gambar 12.** Bilik Hitung *Improved Neubauer* (Luthfi, 2013).

#### b. Motilitas Spermatozoa

Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan metode Partodihardjo. Untuk menentukan motilitas spermatozoa, diambil

spermatozoa dari kauda epididimis seperti penjelasan di atas kurang lebih 10-15  $\mu$ l ke atas gelas objek lalu ditutup dengan kaca penutup. Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan menghitung persentase spermatozoa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 kali, dihitung yang pergerakannya progresif maju ke depan dibandingkan dengan seluruh teramati (bergerak dan tidak bergerak) kemudian dikali dengan 100% (Rahmanisa & Maisuri, 2013).

$$\% \text{ motilitas} = \frac{\text{jumlah spermatozoa bergerak } (n)}{\text{total spermatozoa yang diamati } (N)} \times 100\%$$

### 3.7 Identifikasi dan Definisi Operasional Variabel

#### 3.7.1 Identifikasi Variabel

##### a. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit manggis dan paparan gelombang elektromagnetik *handphone*.

##### b. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah dan motilitas spermatozoa tikus.

##### c. Variabel perantara, variabel ini dibagi menjadi dua :

i. Dapat dikendalikan, yang termasuk dalam variabel ini diantaranya adalah sebagai berikut.

1. Berat badan dan makanan tikus
  2. Lingkungan tempat tinggal
  3. Jumlah waktu paparan
  4. Dosis ekstrak kulit manggis
- ii. Tidak dapat dikendalikan, yang termasuk dalam variabel ini diantaranya adalah sebagai berikut.
1. Respon tikus terhadap paparan gelombang elektromagnetik.
  2. Farmakokinetik dan farmakodinamik ekstrak kulit manggis.

### 3.7.2 Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3.** Definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
<b>Gelombang elektromagnetik</b>	Paparan gelombang elektromagnetik berasal dari <i>handphone</i> yang diletakkan di tengah kantung kemudian dibiarkan dalam kondisi <i>talk mode</i> durasi 3 jam/hari selama 28 hari.	<i>Stopwatch</i>	K1 = Kontrol K2, P1, P2, P3 = 3 jam	Kategorik
<b>Ekstrak Manggis Kulit</b>	Kulit manggis yang diekstrak menggunakan pelarut etanol, kemudian diberikan secara peroral selama 28 hari. Dosis yang digunakan adalah 50, 100, dan 200 mg/kgbb/hari.	Perhitungan manual	Larutan dengan dosis, volume dan konsentrasi tertentu.	Numerik
<b>Jumlah spermatozoa</b>	Jumlah spermatozoa dihitung menggunakan bilik hitung <i>Improved Neubauer</i> pada permukaan seluas 1 mm <sup>2</sup> perbesaran 400x, kemudian hasilnya dikali 200.000 spermatozoa/ml (Gandasoebrota, 1967).	Bilik hitung <i>Improved Neubauer</i> , kalkulator	Jumlah spermatozoa/ml	Numerik
<b>Motilitas spermatozoa</b>	Spermatozoa yang terlihat bergerak ataupun tidak bergerak pada saat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x. % motilitas = $n/N \times 100\%$ (Rahmanisa & Maisuri, 2013).	Kriteria klasifikasi motilitas spermatozoa, kalkulator	Persentase spermatozoa motil dibandingkan total spermatozoa yang diamati	Numerik

### 3.8 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan berupa data numerik yang terdiri atas rerata jumlah spermatozoa/ml dan rerata persentase motilitas spermatozoa untuk setiap kelompok.

### 3.9 Pengolahan Data

Data yang telah diperoleh dari proses pengumpulan data diubah ke dalam bentuk tabel, kemudian proses pengolahan data menggunakan program komputer yang terdiri beberapa langkah sebagai berikut:

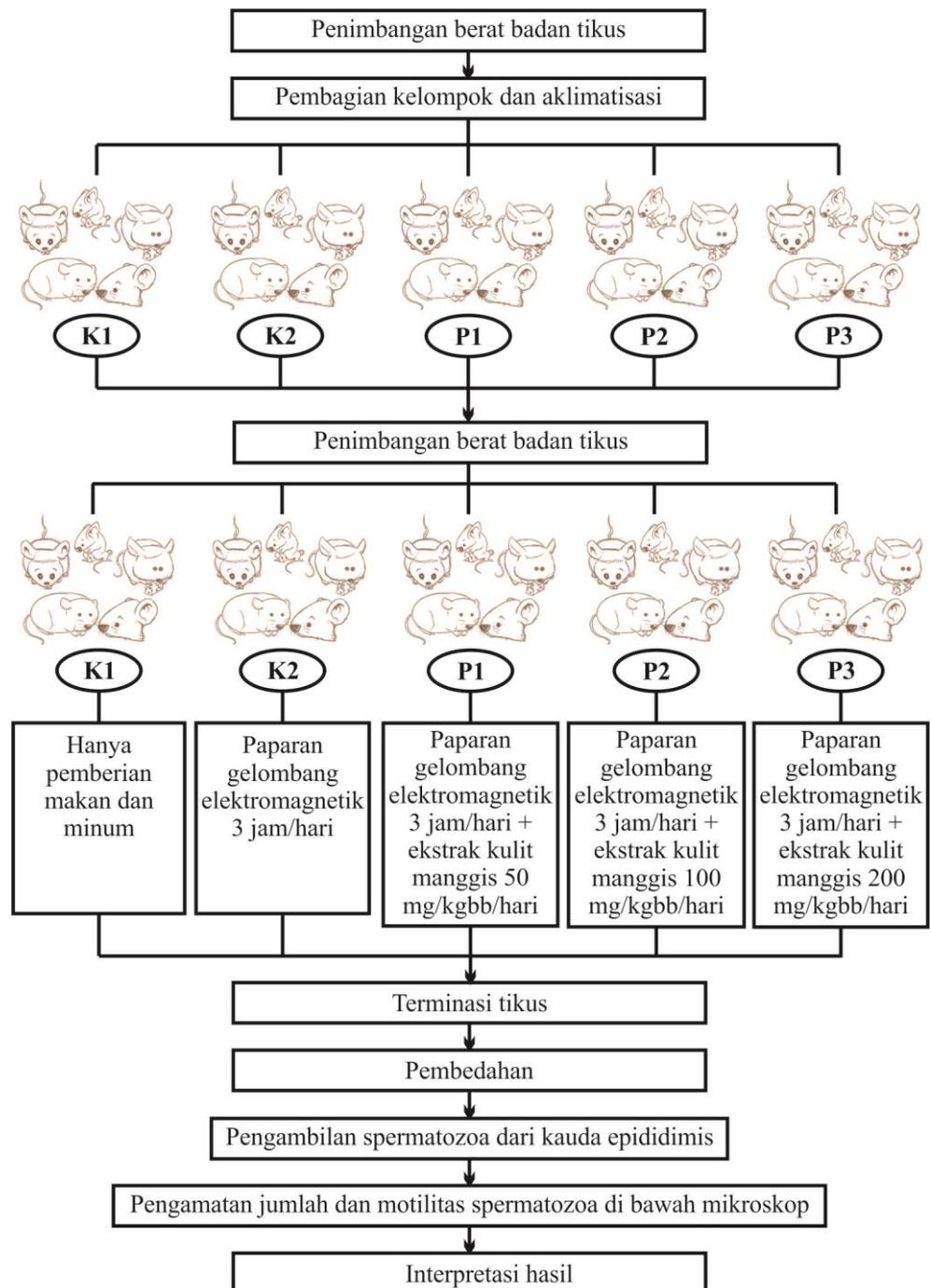
1. Koding, untuk mengkonversikan (menerjemahkan) data yang dikumpulkan selama penelitian ke dalam simbol yang cocok untuk keperluan analisis.
2. *Data entry*, memasukkan data ke dalam komputer.
3. Verifikasi, memasukkan data pemeriksaan secara visual terhadap data yang telah dimasukkan ke dalam komputer.
4. *Output* komputer, hasil yang telah dianalisis oleh komputer kemudian dicetak.

### 3.10 Analisis Data

Analisis statistik untuk mengolah data yang diperoleh menggunakan program komputer dengan analisis bivariat. Analisis bivariat adalah analisis yang digunakan untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dengan variabel terikat dengan menggunakan uji statistik. Hasil penelitian dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel  $\leq 50$ , untuk mengetahui

kenormalan distribusi data. Kemudian dilakukan uji *Levene* untuk mengetahui varians data. Data yang berdistribusi normal dan homogen dilakukan uji parametric *One Way Anova*. Sedangkan, data yang distribusinya tidak normal dilakukan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*. Hasil uji yang menunjukkan data signifikan ( $p < 0,05$ ) dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

### 3.11 Alur Penelitian



**Gambar 13.** Diagram alur penelitian.