III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis dari penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain penelitian menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang dipilih secara acak dan dibagi menjadi lima kelompok. Pengukuran kadar glukosa darah hewan coba yang dijadikan data adalah kadar glukosa kontrol, diberi paparan gelombang elektromagnetik *handphone* periode kronik 3 jam, diberi paparan gelombang elektromagnetik *handphone* periode kronik 3 jam dan ekstrak kulit manggis secara berturut-turut 50, 100 dan 200 mg/kgBB.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Perlakuan hewan coba dilakukan di *animal house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada bulan Agustus sampai November 2015. Pengambilan darah tikus dan pengukuran kadar glukosa darah dilakukan

di Laboratorium Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi Penelitian

Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* berusia 2-3 bulan atau 10-12 minggu dengan berat badan 200 – 300 gram yang diperoleh dari Palembang Tikus Center (PTC).

3.3.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian dipilih secara acak berjumlah 25 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok, sesuai dengan rumus Frederer.

Rumus Frederer :

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

Keterangan :

t = merupakan jumlah kelompok perlakuan dan n = jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi :

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 4 ekor. Namun, jumlah sampel awal ini harus diolah untuk diperhitungkan kembali agar dapat mengantisipasi hilangnya unit eksperimen, dengan rumusan sebagai berikut

$$N = n / (1-f)$$

Keterangan:

N = Besar sampel koreksi

n = Besar sampel awal

f = Perkiraan proporsi dropout sebesar 10 %

Sehingga,

$$N = n / (1-f)$$

$$N = 4 / (1-10\%)$$

$$N = 4 / (1-0,1)$$

$$N = 4 / 0,9$$

$$N = 4,44 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}$$

Jadi sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor. Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus yang dibagi kedalam 5 kelompok.

3.3.3. Kelompok Perlakuan

1. Kelompok 1 (K1): Kelompok tikus yang tidak dipapar oleh gelombang elektromagnetik *handphone* dan tidak diberi ekstrak etanol kulit manggis (kelompok K1).

2. Kelompok 2 (K2): Kelompok tikus yang dipapar gelombang elektromagnetik *handphone* dengan durasi 3 jam per hari selama 28 hari dan diberikan cairan NaCl (kelompok K2).
3. Kelompok 3 (P1): Kelompok tikus yang dipapar gelombang elektromagnetik *handphone* dengan durasi 3 jam per hari selama 28 hari dan diberikan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 50 mg/kgBB (kelompok P1).
4. Kelompok 4 (P2): Kelompok tikus yang dipapar gelombang elektromagnetik *handphone* dengan durasi 3 jam per hari selama 28 hari dan diberikan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 100 mg/kgBB (kelompok P2).
5. Kelompok 3 (P3): Kelompok tikus yang dipapar gelombang elektromagnetik *handphone* dengan durasi 3 jam per hari selama 28 hari dan diberikan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 200 mg/kgBB (kelompok P3).

3.4. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

3.4.1. Kriteria Inklusi

1. Tikus sehat
2. Tikus berjenis kelamin jantan
3. Berat badan 200 – 300 gram
4. Usia 2 – 3 bulan

3.4.2. Kriteria Eksklusi

1. Berat badan tikus menurun hingga berat badannya kurang dari 180 gram
2. Penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal.

3.5. Alat dan Bahan

3.5.1. Alat

1. Kandang tikus terbuat dari plastik berukuran 40x20x20 cm^3 dengan tutup kawat dan alas diberi sekam padi
2. Kandang modifikasi dari plastik berbentuk tabung
3. *Handphone*
4. Pisau dan wadah pengeringan
5. Oven, untuk pengeringan kulit manggis
6. Blender, untuk menghaluskan kulit manggis
7. Termometer dan gelas ukur
8. *Rotary evaporator*, untuk pembuatan ekstrak kulit manggis
9. Neraca digital (*micro analytical balance*) untuk menimbang ekstrak kulit manggis
10. Timbangan digital untuk hewan
11. Sonde tikus
12. Stopwatch
13. Botol minuman
14. Tempat makan

15. Spuit injeksi (untuk pengambilan darah)
16. Spektrofotometer
17. Tabung glass
18. Alat Sentrifugasi
19. *Vacutainer*
20. Mikropipet

3.5.2. Bahan

1. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dewasa galur *Sprague dawley* berumur 2-3 bulan atau 10-12 minggu
2. Ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.)
3. Pakan tikus berupa pakan AD II
4. Ketamine
5. Aquades
6. Larutan etanol, eter, dan NaCl 0,9%
7. Reagen Glukosa

3.6. Identifikasi Variabel

Pada penelitian ini terdapat tiga variabel, yaitu variabel independen (variabel bebas), variabel dependen (variabel terikat), dan variabel perantara.

1) Variabel independen
   a. Paparan gelombang elektromagnetik dari *handphone*.
   b. Ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.).

2) Variabel dependen adalah kadar glukosa darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*.

3) Variabel perantara dibagi menjadi dua:

   a. Dapat dikendalikan :

      1. Jenis tikus
      2. Berat badan tikus
      3. Umur tikus
      4. Makanan tikus
      5. Minuman tikus
      6. Lingkungan tempat tinggal
      7. Kelembaban
      8. Dosis ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.)

   b. Tidak dapat dikendalikan:

      1. Respon tikus terhadap paparan stres
      2. Absorpsi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.)
      3. Metabolisme glukosa pada tikus.

3.7. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Gelombang Elektro-magnetik	Paparan gelombang elektromagnetik berasal dari *handphone* dilakukan dengan cara meletakkan *handphone* di dalam kandang kemudian dibiarkan dalam kondisi *talk mode* dengan waktu perlakuan 3 jam/hari selama 28 hari.	Log Panggilan	K1 = Kontrol K2, P1, P2, P3 = 3 jam	Numerik
Ekstrak kulit buah manggis	Pemberian ekstrak etanol yang dibuat dengan metode maserasi. Dosis yang digunakan adalah 50, 100 dan 200 mg/kgBB dan diberikan selama 28 hari. Waktu pemberian adalah 30 menit sebelum paparan terhadap ponsel dilakukan. Ekstrak dilarutkan dalam NaCl 0,9%, secara per oral dengan sonde (Pasaribu *et al.*, 2012)	Perhitungan manual	Larutan dengan dosis, volume dan konsentrasi tertentu	Numerik
Kadar Glukosa Darah	Kadar glukosa darah puasa dalam serum darah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*	Spektrofoto-meter	mg/dL	Numerik

3.8. Prosedur Penelitian

3.8.1. *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.

3.8.2. 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).

3.8.3. 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 secara *ad libitum.*

3.8.4. Pembagian Kelompok

Tabel 2. Pembagian Kelompok Perlakuan

Kelompok	Perlakuan
Kelompok K1	Kelompok kontrol normal tanpa perlakuan paparan gelombang elektromagnetik *handphone* dan tanpa pemberian ekstrak etanol kulit manggis
Kelompok K2	Kelompok kontrol dengan perlakuan paparan gelombang elektromagnetik selama 3 jam / hari dengan pemberian cairan NaCl
Kelompok P1	Kelompok perlakuan coba dengan pemberian paparan gelombang elektromagnetik *handphone* selama 3 jam / hari dan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 50 mg/kgBB
Kelompok P2	Kelompok perlakuan coba dengan pemberian paparan gelombang elektromagnetik *handphone* selama 3 jam / hari dan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 100 mg/kgBB
Kelompok P3	Kelompok perlakuan coba dengan pemberian paparan gelombang elektromagnetik *handphone* selama 3 jam / hari dan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 200 mg/kgBB

3.8.5. Prosedur Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis

a) Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Manggis

1. Determinasi buah manggis.

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

2. Pembuatan ekstrak etanol kulit manggis.

   Fermentasi dilakukan pada kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). Kulit buah manggis yang sudah dilepaskan dari

daging buah dan kulit luar yang keras, dipotong-potong dengan ukuran kurang lebih 0,50 cm^2. Potongan tersebut kemudian dikeringkan dengan oven bersuhu 50^0C selama 6 jam. Kulit yang kering dihaluskan dengan blender hingga menjadi bubuk yang selanjutnya diayak menggunakan ayakan ukuran 60 *mesh* sehingga diperoleh bubuk simplisia kulit manggis. Ekstraksi dilakukan dengan cara merendam bubuk simplisia kulit manggis dalam pelarut etanol 40% selama 24 jam pada suhu ruang (25-27ºC). Setelah proses maserasi berakhir, dilakukan penyaringan hingga didapatkan filtrat dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada tekanan 60 mBar suhu 50°C. Pembuatan ekstrak kulit manggis dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Bogor.

3. Pemberian ekstrak etanol kulit manggis dilakukan selama 28 hari dan 30 menit sebelum dilakukan induksi gelombang elektromagnetik *handphone* (Dyahnugra & Widjanarko, 2015).

b) Cara Perhitungan Dosis Ekstrak Kulit Manggis

Dosis kulit manggis pada eksperimen ini adalah 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB, di mana dosis tersebut mampu mempengaruhi metabolisme glukosa darah (Pasaribu *et al*., 2012).

Dosis tikus (100 g) = 50 mg/kgBB x100 gBB

= 0,05 mg x 100

= 5 mg

Dosis untuk 100 gram tikus adalah 5 mg. Dalam penelitian ini kelompok kontrol 1 (K1) dan kontrol 2 (K2) tidak diberikan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.). Dosis pertama ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) diambil dari dosis normal tikus, sedangkan dosis kedua diambil dari hasil pengalian 2x dosis pertama dan dosis ketiga diambil dari hasil pengalian 4x dari dosis pertama atau 2x dari dosis kedua (Susanto, 2014).

1. Dosis untuk tiap tikus kelompok III

   5 mg/100gBB

2. Dosis untuk tiap tikus kelompok IV

   10 mg/100gBB

3. Dosis untuk tiap tikus kelompok V

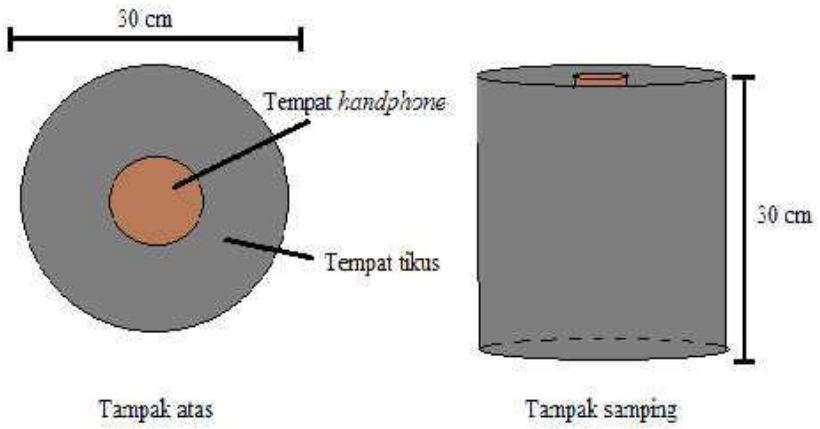
   20 mg/100gBB

Volume ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) diberikan secara oral sebanyak 1 mL yang merupakan volume yang boleh diberikan berdasarkan pada volume normal lambung tikus yaitu 3-5 mL. Jika volume ekstrak melebihi volume lambung, dapat berakibat dilatasi lambung secara akut yang dapat menyebabkan robeknya saluran cerna (Ngatidjan, 2006).

3.8.6. 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 (Meo & Al Rubeaan, 2013). Paparan tersebut dilakukan setiap hari pada malam hari, 30 menit setelah hewan diberikan ekstrak kulit manggis. Pemaparan dilakukan mulai dari pukul 18.00 WIB hingga pukul 21.00 WIB selama 28 hari. Pada kelompok K1 tidak diberi paparan.



Gambar 6. Sketsa kandang tikus modifikasi untuk paparan (Victorya, 2015)

3.8.7. Prosedur Pengambilan Darah Hewan Coba

Setelah 28 hari, lima tikus jantan dari tiap kelompok akan diambil darahnya. Sebelum pengambilan darah, tikus dipuasakan selama 8 – 10 jam terlebih dahulu. Setelah itu, tikus dianastesi dengan Ketamine 75-100 mg/kg secara intraperitoneal dilanjutkan dengan pembedahan. Kemudian sebanyak 3 mL darah diambil dari jantung, lalu dikumpulkan dalam vacutainer serum.

3.8.8. Prosedur Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah Tikus

Darah yang telah diambil dari jantung tikus yang dikumpulkan dalam vacutainer serum kemudian disentrifugasi pada 4000 rpm selama 20 menit dan serumnya kemudian digunakan untuk mengetahui kadar glukosa tikus. Kadar glukosa dihitung dengan spektrofotometer.

3.9. Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan berupa data numerik yang terdiri atas rerata kadar glukosa darah untuk setiap kelompok.

3.10. Pengolahan Data

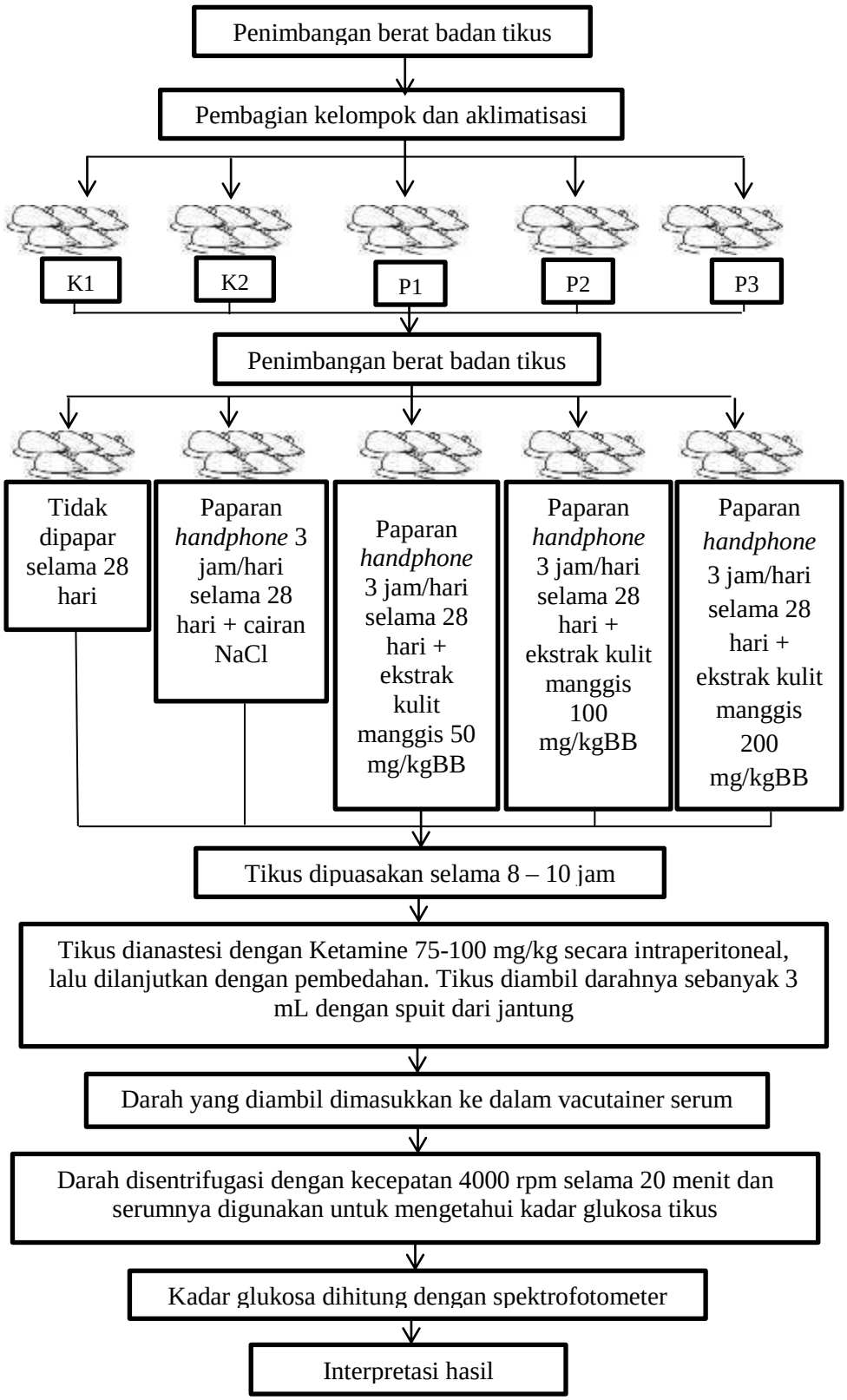
Data yang telah diperoleh dari proses pengumpulan data akan diubah ke dalam bentuk tabel, kemudian proses pengolahan data menggunakan program komputer yang terdiri beberapa langkah sebagai berikut:

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.

3.11. Analisis Data

Analisis statistik untuk mengolah data yang diperoleh akan menggunakan program komputer dimana akan dilakukan analisis bivariat. Analisis bivariat adalah analisis yang digunakan untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dengan variabel terikat dengan menggunakan uji statistik. Hasil penelitian dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel ≤50. Kemudian dilakukan uji *Levene* untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data memiliki varians yang sama atau tidak. Karena varians data berdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan metode uji parametrik, digunakan uji *One Way Anova*. Pada uji *One Way Anova* didapatkan hasil $p<0,05$ maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-Hoc* LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

3.12. Diagram Alur Penelitian



Gambar 7. Diagram alur penelitian

3.13. *Ethical Clearance*

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

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 mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer 1967, yaitu $t(n-1) \geq 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.
3. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi di bawah ini:
    a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
    b. Bebas dari ketidaknyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C kemudian hewan coba terbagi menjadi 5 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas

manusia serta kandang dijaga kebersihannya sehingga mengurangi stres pada hewan coba.

Prosedur pengambilan sampel pada akhir penelitian telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan *anesthesia* serta *euthanasia* dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba (Ridwan, 2013).