

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain penelitian menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan pendekatan *Post Test Control Group Design*, dimana sampel dipilih secara acak dengan 25 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* dan dibagi menjadi 5 kelompok kontrol.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Perlakuan dan pengujian pada hewan coba dilakukan di Animal House Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pengambilan darah dilakukan di Balai Veteriner Lampung, sedangkan pengukuran kadar SGOT dan SGPT hewan coba dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus sampai November 2015.

3.3 Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel bebas (*independent variable*)
 - a. Paparan gelombang elektromagnetik yang bersumber dari handphone selama 28 hari.
 - b. Ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*).
2. Variabel terikat (*dependent variable*) pada penelitian ini adalah kadar SGOT dan SGPT tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.
3. Variabel perantara dimana dibagi menjadi 2 yaitu:
 - a. Dapat dikendalikan, yang termasuk dari variabel perantara yang dapat dikendalikan adalah berat badan, usia, makanan, minuman, lingkungan tempat tinggal, kelembapan, jumlah waktu paparan, dosis ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*)
 - b. Tidak dapat dikendalikan, yang termasuk dari variabel perantara yang tidak dapat dikendalikan adalah respon tikus terhadap paparan, proses metabolisme tikus, dan absorpsi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*)

3.4 Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Gelombang Elektromagnetik Handphone	Paparan gelombang elektromagnetik yang berasal dari <i>handphone</i> (SAR 1,56 W/kg) dengan cara dihidupkan dan diaktifkan jaringan komunikasi dan dilakukan panggilan telepon dengan waktu paparan 3 jam selama 28 hari	<i>Stopwatch</i>	K = kontrol K2, P1, P2, P3= 3 jam	Numerik
2	Kadar SGOT	Pada penelitian ini pengambilan darah diambil dengan punsi transkardial sebanyak 3 ml (hindari hemolisis) yang dimasukkan ke dalam tabung vacutest kemudian disentrifugasi untuk mendapatkan plasmanya.	Spektrofotometer	kadarnya dalam Serum dinyatakan dalam UI/L	Numerik
3	Kadar SGPT	Untuk memeriksa kadar SGPT juga dilakukan pengambilan darah dengan punsi transkardial sebanyak 3 ml (hindari hemolisis) yang dimasukkan ke dalam tabung vacutest kemudian disentrifugasi untuk mendapatkan plasmanya.	Spektrofotometer	kadarnya dalam Serum dinyatakan dalam UI/L	Numerik

4	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 (Ayoub <i>et al.</i> , 2010). Waktu pemberian adalah 30 menit sebelum paparan terhadap ponsel dilakukan. Ekstrak dilarutkan dalam NaCl 0,9%, secara peroral dengan sonde (Pasaribu <i>et al.</i> , 2012)	Perhitungan manual	Larutan dengan dosis, volume dan konsentrasi tertentu	Numerik
---	-----------------------------------	--	--------------------	---	---------

3.5 Populasi dan Sampel

3.5.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* dewasa, berumur 2-3 bulan, dengan berat badan 200-300 gram yang diperoleh dari Palembang Tikus *Center*.

3.5.2 Sampel Penelitian

Jumlah sampel berdasarkan kriteria sampel WHO yaitu minimal 5 ekor.

Penentuan besaran ulangan ditentukan dengan menggunakan rumus

Frederer:

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

n : Jumlah sample tiap kelompok

t : Jumlah kelompok

Jadi sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 4 ekor dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 5 kelompok sehingga penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus putih dari populasi yang ada. Untuk mengantisipasi terjadinya tikus yang mati maka dilakukan dengan koreksi :

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

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.

3.6 Kelompok Perlakuan

1. Kelompok 1 (K1) : Kelompok tikus yang tidak dipajankan oleh gelombang elektromagnetik ponsel dan tidak diberi ekstrak etanol kulit manggis (Kelompok Kontrol).
2. Kelompok 2 (K2) : Kelompok tikus yang dipajankan gelombang elektromagnetik ponsel selama 3 jam per hari selama 28 hari tanpa diberikan ekstrak etanol kulit manggis namun ditambah NaCl (Kelompok K2).
3. Kelompok 3 (P1) : Kelompok tikus yang dipajankan gelombang elektromagnetik ponsel selama 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 ponsel dengan durasi 3 jam per hari selama 28 hari dan diberikan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 100 mg/kgBB (kelompok P2).

5. Kelompok 5 (P3): kelompok tikus yang dipapar gelombang elektromagnetik ponsel dengan durasi 3 jam per hari selama 28 hari dan diberikan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 200 mg/kgBB (kelompok P3).

3.7 Kriteria Inklusi

1. Sehat (rambut tidak tampak kusam, tidak rontok, dan bergerak aktif)
2. Jantan
3. Berat badan 200-300 gram
4. Usia 2-3 bulan
5. Tikus putih jantan galur *Sprague dawley*.

3.8 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi pada penelitian ini yaitu;

1. Mati selama perlakuan.
2. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok, botak, dan tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, atau genital).
3. Kehilangan berat badan >10% setelah masa adaptasi di laboratorium.

3.9 Alat dan Bahan

3.9.1. Alat penelitian

- Kandang tikus terbuat dari plastik berukuran 40x20x20 cm³ dengan tutup kawat dan alas diberi sekam padi.
- *Handphone* (SAR 1,56 W/kg)
- Alat untuk membuat ekstrak yaitu *Rotary Evaporator*
- Timbangan hewan
- Botol minum 250 ml
- Tempat makan
- Stopwatch
- Kamera video dan *Lazy pod*
- Timbangan digital untuk menimbang ekstrak manggis
- Sonde tikus
- Spektrofotometer
- Tabung reaksi dan rak
- Spuit 1cc
- Alat bedah minor
- Handschoen, kapas, dan alkohol
- Mikropipet
- Tabung venoject
- Alat sentrifugasi
- Kandang modifikasi

3.9.2. Bahan Penelitian

- Tikus putih jantan (*Rattus novogicus*) dewasa galur Sprague Dawley berumur 2-3 bulan atau 10-12 minggu
- Ekstrak kulit buah manggis yang diekstraksi dengan cara maserasi dengan etanol.
- Plasma darah (hindarkan hemolisis)
- Reagen SGOT : EDTA 5 mmol/L, 2-Oxoglutarate 12 mmol/L, L-aspartate 200 mmol/L, MDH 495 UI/L, LDH 820 UI/L, NADH \leq 0,18 mmol/L, tampon tris 80 mmol/L, PH 30° C
- Reagen SGPT : 2-Oxoglutarate 15 mmol/L, L-alanine 500 mmol/L, LDH \geq 1600 UI/L, NADH \leq 0,18 mmol/L, Tris Buffer 100 mmol/L, PH 30° C
- Pakan tikus
- Ketamine
- Aquades
- EDTA
- Larutan etanol, eter, dan NaCl 0,9%

3.10 Prosedur Penelitian

3.10.1 *Ethical Clearance*

Penelitian ini dimulai dengan pengajuan proposal ethical clearance ke Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk mendapatkan

izin etik penelitian menggunakan 25 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dengan galur *Sprague-Dawley* dengan menerapkan prinsip 3R yaitu *Replacement*, *Reduction* dan *Refinement* dalam protokol penelitian.

3.10.2 Pengadaan Hewan Coba

Pada penelitian hewan coba yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dengan galur *Sprague-Dawley* sebanyak 25 ekor yang diperoleh dari Palembang Tikus *Center*.

3.10.3 Pembagian Kelompok

Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih yang dibagi secara acak kedalam 5 kelompok percobaan. Dilakukan penimbangan berat sebelum aklimatisasi selama 1 minggu. Penimbangan berat badan dilakukan kembali setelah masa adaptasi dan selama perlakuan. Kelompok percobaan K1 kelompok tikus yang tidak dipajankan oleh gelombang elektromagnetik ponsel dan tidak diberi ekstrak etanol kulit manggis. Setelah 28 hari di nilai kadar SGOT dan SGPT dengan spektrofotometer. Kelompok percobaan K2 kelompok tikus yang dipajankan gelombang elektromagnetik ponsel selama 3 jam per hari selama 28 hari tanpa diberikan ekstrak etanol kulit manggis + NaCl. Setelah 28 hari di kadar SGOT dan SGPT dengan menggunakan spektrofotometer. Kelompok percobaan P1 kelompok tikus yang dipajankan

gelombang elektromagnetik ponsel selama 3 jam per hari selama 28 hari dan diberikan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 50 mg/kgBB. Setelah 28 hari di nilai kadar SGOT dan SGPT dengan spektrofotometer. Kelompok percobaan P2 kelompok tikus yang dipapar gelombang elektromagnetik ponsel dengan durasi 3 jam per hari selama 28 hari dan diberikan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 100 mg/kgBB. Setelah 28 hari di nilai kadar SGOT dan SGPT dengan spektrofotometer. Dan kelompok percobaan P3 kelompok tikus yang dipapar gelombang elektromagnetik ponsel dengan durasi 3 jam per hari selama 28 hari dan diberikan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 200 mg/kgBB. Setelah 28 hari di nilai kadar SGOT dan SGPT dengan spektrofotometer.

3.10.4 Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis

Proses pembuatan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dalam penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut. Penelitian ini menggunakan pelarut etanol 40 %. Kulit manggis dideterminasi oleh LIPI (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia) Bogor dengan nomor surat 4738/IPH.3./KS/IX/2015.

3.11 Prosedur Perlakuan Hewan Coba

3.11.1 Prosedur Pemaparan Gelombang Elektromagnetik

Pemaparan gelombang elektromagnetik *handphone* (SAR 1,56 W/kg) dilakukan dengan menggunakan kandang modifikasi khusus untuk pemaparan. *Handphone* (SAR 1,56 W/kg) diletakkan dalam posisi hidup ditengah-tengah kandang yang mempunyai tempat khusus *handphone*, lalu dilakukan panggilan telepon dengan menggunakan *handphone* lain. Tikus dimasukkan ke dalam kandang modifikasi tanpa fiksasi gerakan dan diberikan paparan sesuai dengan kelompok perlakuan. 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. Saat pemaparan, ponsel dibuat dalam keadaan menerima panggilan telepon selama 3 jam Setelah pemaparan selesai, hewan coba dipindahkan kembali ke kandang pemeliharaan sesuai kelompoknya.

3.11.2 Tahap Pengambilan Sampel Darah

Pemeriksaan sampel darah dilakukan setelah tahap perlakuan berakhir yaitu pada hari ke – 28. Pengambilan sampel darah dilakukan secara transkardial dengan alat suntik sebanyak 3 ml. Sebelum dilakukan pengambilan sampel darah, semua peralatan dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70 %. Kemudian, tikus diambil dari kandang dan dianestesi Ketamine 0,3 ml secara subkutan. Darah yang telah diambil dimasukkan dalam tabung *venoject* yang bersih dan kering, kemudian disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Serum yang terpisah diambil dan dimasukkan dalam tabung lainnya yang bersih dan kering dan ditutup. Jika serum tidak langsung diperiksa, maka harus disimpan pada lemari es suhu 2°C -8°C selama maksimal 4 hari, karena jika lebih dari 4 hari akan mengalami degradasi aktivitas sebesar 10% (Rafika *et al.*, 2005).

3.11.3 Tahap Penghitungan SGOT dan SGPT

Tahap perhitungan SGOT memipet sampel serum sebanyak 100 µl dan reagen SGOT sebanyak 1000 µl atau 1mL ke dalam kuvet menggunakan mikropipet dengan skala yang sudah diatur sebelumnya. Pemipetan menggunakan mikropipet bertujuan supaya diperoleh volume yang lebih akurat karena akurasi mikropipet ini sangat tinggi. Tip yang digunakan pun harus diperhatikan

kebersihannya untuk meminimalisir kontaminasi yang mempengaruhi absorbansi sampel.

Keduanya zat dicampur dan diinkubasi selama 5 menit dalam suhu ruang. Inkubasi ini dilakukan agar serum dan reagen bereaksi. Reagen SGOT yang berisi EDTA 5 mmol/L, 2-Oxoglutarate 12 mmol/L, L-aspartate 200 mmol/L, MDH 495 UI/L, LDH 820 UI/L, $\text{NADH} \leq 0,18$ mmol/L, tampon tris 80 mmol/L, PH 30° C. Tris pH 7,80 dalam reagen SGOT berfungsi menjaga pH serum selama reaksi pemeriksaan ini supaya menjaga kestabilan aktivitas SGOT karena enzim sangat sensitif terhadap perubahan pH. L-Aspartat berfungsi sebagai asam amino yang akan diubah menjadi L-glutamat dengan dikatalisis oleh enzim Glutamat Oxaloacetat Transaminase (GOT). Malat Dehidrogenase (MDH) dan Laktat Dehidrogenase (LDH) juga merupakan enzim yang akan mengkatalisis reaksi selanjutnya dari produk yang dihasilkan dari reaksi dengan katalisator SGOT tadi.

Setelah diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang, campuran yang telah berisi reagen diukur selama 3 menit dengan spektrofotometer. Pada setiap menitnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang 340 nm karena pada panjang gelombang tersebut, sampel akan memberikan serapan maksimum. Dilakukan pengukuran dengan menggunakan

spektrofotometer UV/Vis karena mempunyai sensitivitas yang relatif tinggi, pengerjaannya mudah sehingga pengukuran yang dilakukan cepat, dan mempunyai spesifisitas yang baik.

Kuvet dimasukkan ke dalam Spektrofotometer UV/Vis untuk diukur absorbansinya. Namun sebelumnya dilakukan blanko terlebih dahulu. Pembuatan larutan blanko sama dengan pembuatan larutan sampel yang akan diuji, tetapi hanya berisi reagen SGOT tanpa adanya sampel. Blanko ini berfungsi supaya alat spektrofotometer UV/Vis mengenal matriks selain sampel sebagai pengotor. Kemudian *setting blank* sehingga ketika pengukuran hanya sampel yang diukur absorbansinya. Setelah itu, kuvet yang berisi sampel dimasukkan ke tempat kuvet dan dilihat absorbansinya pada layar *readout*. Kuvet diambil dan diukur lagi setelah interval waktu 1 menit selama 3 menit. Sebelum pengukuran sampel, selalu dilakukan blanko.

Selama proses pemeriksaan ini, bagian bening kuvet tidak boleh disentuh oleh tangan karena sumber sinar akan diteruskan melalui bagian bening kuvet. Jika bagian bening kuvet terkontaminasi oleh tangan, maka akan mempengaruhi nilai absorbansi. Hal ini akan memungkinkan kesalahan dalam menginterpretasikan data yang diperoleh. Pada prinsipnya, suatu molekul yang dikenai suatu radiasi elektromagnetik pada frekuensi yang sesuai akan menyerap

energy dan energi molekul tersebut ditingkatkan ke level yang lebih tinggi, sehingga terjadi peristiwa penyerapan (absorpsi) energi oleh molekul. Banyaknya sinar yang diabsorpsi pada panjang gelombang tertentu sebanding dengan banyaknya molekul yang menyerap radiasi, dan jumlah cahaya yang diabsorpsi berbanding lurus dengan konsentrasinya sesuai hukum *lambert-beer*. Setelah dilakukan pengukuran absorbansi, data dicatat untuk dihitung dan diinterpretasikan.

Untuk pemeriksaan SGPT cara kerja sama dengan pemeriksaan SGOT, namun untuk reagen pada SGPT berisikan 2-Oxoglutarate 15 mmol/L, L-alanine 500 mmol/L, LDH \geq 1600 UI/L, NADH \leq 0,18 mmol/L, Tris Buffer 100 mmol/L, PH 30° C

3.12 Pengumpulan, Pengolahan, dan Analisis Data

3.12.1 Pengumpulan Data

Pengumpulan data penelitian dilakukan dengan menghitung:

1. Hasil rata-rata kadar SGOT dalam serum dinyatakan dalam UI/L pada masing-masing kelompok penelitian.
2. Hasil rata-rata kadar SGPT dalam serum dinyatakan dalam UI/L pada masing masing kelompok penelitian.

3.12.2 Pengolahan Data

Data yang telah diperoleh dari proses pengumpulan data akan diubah kedalam bentuk tabel - tabel, kemudian proses pengolahan data menggunakan program komputer yang terdiri beberapa langkah:

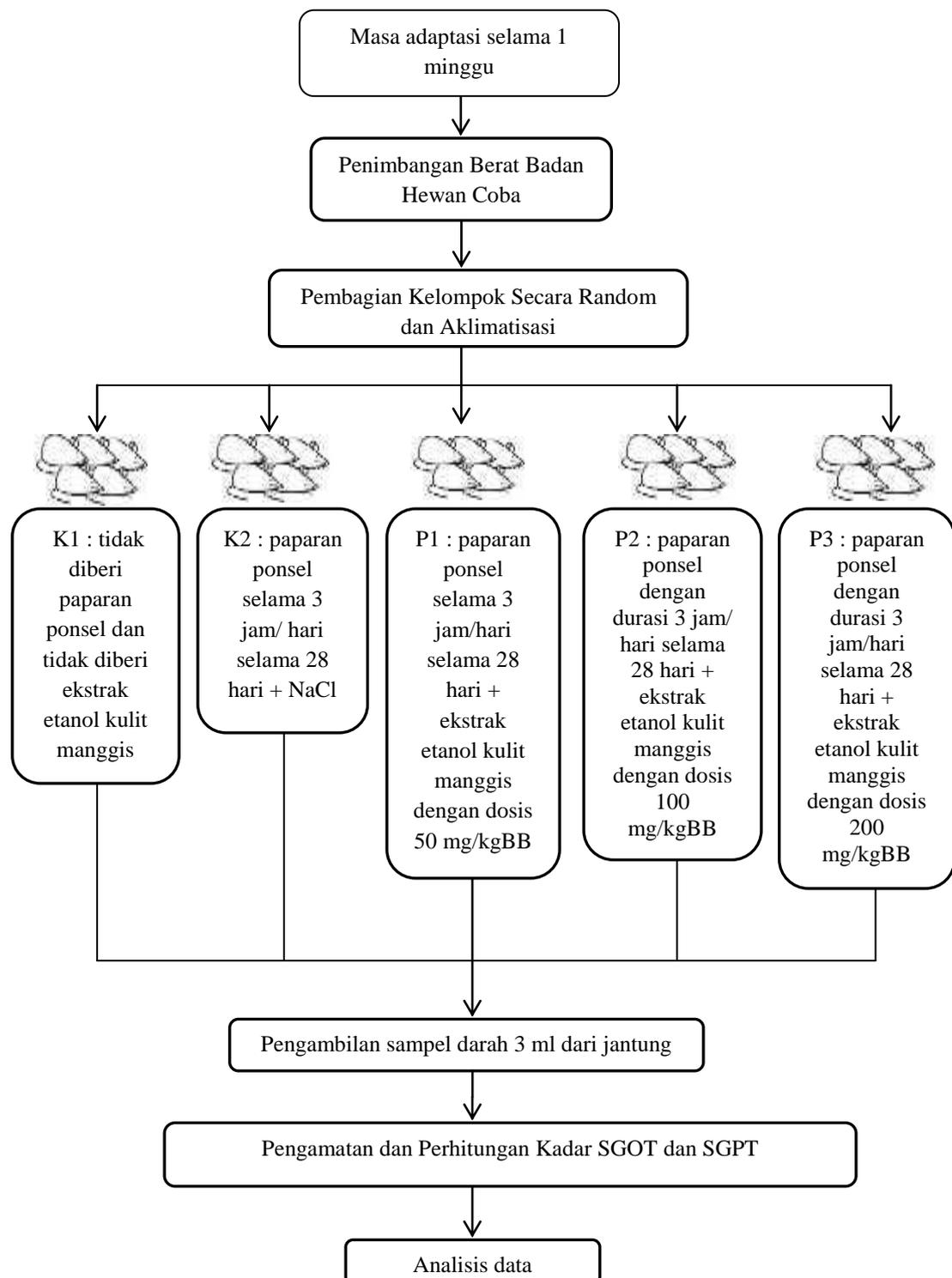
1. Koding, untuk mengkonversikan (menerjemahkan) data yang dikumpulkan selama penelitian kedalam simbol yang cocok untuk keperluan analisis.
2. *Data entry*, memasukkan data kedalam komputer.
3. Verifikasi, memasukkan data pemeriksaan secara visual terhadap data yang telah dimasukkan kedalam komputer.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

3.12.3 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. Jika varians data berdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan metode uji parametrik, digunakan uji *One Way Anova*. Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, digunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*. Hipotesis dianggap bermakna bila $p < 0,05$. Jika pada uji *One Way Anova* atau *Kruskal-Wallis* menghasilkan $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-hoc* LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan. Sedangkan jika pada uji *Kruskal-Wallis* menghasilkan $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Mann-Whitney*.

3.13 Diagram Alur Penelitian



Gambar 8. Diagram Alur Penelitian

3.14 Etika Penelitian

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

- a. *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. *Replacement* terbagi menjadi dua bagian, yaitu: relatif (mengganti hewan percobaan dengan memakai organ/jaringan hewan dari rumah potong, hewan dari ordo lebih rendah) dan absolut (mengganti hewan percobaan dengan kultur sel, jaringan, atau program komputer).
- b. *Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian seminimal mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah minimal biasa dihitung menggunakan rumus Frederer yaitu $(n-1)(t-1) > 15$ (Shaw *et al.* 2002).
- c. *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi (*humane*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Pada dasarnya prinsip *refinement* berarti membebaskan hewan coba dari beberapa kondisi yaitu bebas dari rasa lapar dan haus dan hewan percobaan bebas dari ketidaknyamanan (Bousfield dan Brown 2010).