BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design*. 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).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2015–November 2015 dan dilakakukan dibeberapa tempat antara lain :

1. *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk proses paparan hewan coba terhadap gelombang elektromagnetik.
2. Laboratorium bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk pembuatan preparat.

3.3 Populasi dan Sample

3.3.1 Populasi Penelitian

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

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian dipilih secara acak berjumlah 20 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali, sesuai dengan rumus Frederer.

Rumus Frederer :

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

Keterangan :

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 4 ekor ($n \geq 4$) dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 5 kelompok

sehingga penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus putih dari populasi yang ada. Untuk mengantisipasi hilangnya eksperimen maka dilakukan dengan koreksi:

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

Keterangan :

N = besar sampel koreksi

n = besar sampel awal

f = perkiraan proporsi drop out 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 : Kelompok tikus tidak diberi paparan gelombang elektromagnetik *handphone* dan tidak diberi ekstrak etanol kulit manggis (Kelompok Kontrol 1).
2. Kelompok 2 : Kelompok tikus diberi paparan gelombang elektromagnetik *handphone* dan diberikan NaCl 0,9% selama 3 jam dalam 28 hari (Kelompok Kontrol 2).
3. Kelompok 3 : Kelompok tikus diberi paparan gelombang elektromagnetik *handphone* selama 3 jam dalam 28 hari dan diberi ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 50 mg/kgBB (12 mg/KgBB dosis manusia) (Kelompok Perlakuan 1).
4. Kelompok 4 : Kelompok tikus diberi paparan gelombang elektromagnetik *handphone* selama 3 jam dalam 28 hari dan diberi ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 100 mg/kgBB (24 mg/KgBB dosis manusia) (Kelompok Perlakuan 2).
5. Kelompok 5 : Kelompok tikus diberi paparan gelombang elektromagnetik *handphone* selama 3 jam dalam 28 hari dan diberi ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 200 mg/kgBB (48 mg/KgBB dosis manusia) (Kelompok Perlakuan 3).

3.3.4 Kriteria Inklusi

1. Sehat (tidak nampak sakit, rambut tidak rontok dan tidak nampak kusam, aktivitas aktif).
2. Jantan.
3. Berat Badan 200–300 gram.
4. Usia 2–3 bulan atau 10–12 minggu.

3.3.5 Kriteria Eksklusi:

1. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi.
2. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus serta genital).
3. Mati selama masa pemberian perlakuan.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

1. Kandang tikus terbuat dari bahan plastik berukuran 40x20x20 cm^3 dengan tutup kawat.
2. Kandang tikus modifikasi untuk melakukan paparan gelombang elektromagnetik *handphone*.
3. Tempat makan dan minum hewan.

4. *Handphone*.
5. Timbangan untuk menimbang ekstrak manggis.
6. Timbangan digital untuk menimbang berat badan tikus.
7. Sonde lambung untuk pemberian ekstrak pada tikus.
8. *Stopwatch.*
9. Spuit 1 cc.
10. Alat bedah minor.
11. Tabung untuk meletakan organ pankreas.
12. *Handschoen*, kapas, dan alkohol.
13. Mikroskop.

3.4.2 Bahan Penelitian

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu :

1. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley.*
2. Pakan hewan berupa pelet.
3. Ekstrak kulit buah manggis.
4. Larutan etanol dan NaCl 0,9%.
5. Ketamin.

3.5 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

3.5.1 Identifikasi Variabel

a) Variabel Bebas

Pada penelitian ini variabel bebas adalah ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia Mangostana* L.) yang diberikan kepada tikus putih *(Rattus norvegicus*) jantan galur *Spargue dawley* dan paparan gelombang elektromagnetik *handphone.*

b) Variabel Terikat

Pada penelitian ini yang termasuk ke dalam variabel terikat adalah gambaran histopatologi pankreas yang dipapari gelombang elektromagnetik *handphone*.

c) Variabel Perantara

1. Variabel yang dapat dikendalikan

   Yang termasuk dalam variabel perantara yang dapat dikendalikan adalah jenis tikus, umur tikus, makanan tikus, minuman tikus, dosis ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.).

2. Variabel yang tidak dapat dikendalikan

   Variabel perantara yang tidak dapat dikendalikan adalah absorbsi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) dan respon tikus terhadap gelombang elektromagnetik.

3.5.2 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Ekstrak kulit buah manggis	Pemberian ekstrak etanol yang dibuat dari kulit buah manggis 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 *handphone* dilakukan. Ekstrak dilarutkan dalam NaCl 0,9%, secara peroral dengan sonde.	Perhitungan manual	Larutan dengan dosis, volume dan konsentrasi tertentu.	Numerik
Gelombang Elektro-magnetik *handphone*	Paparan gelombang Elektromagnetik yang berasal dari *handphone* dengan cara dihidupkan, diaktifkan jaringan komunikasi dan dilakukan panggilan telepon selama 3 jam. Paparan dilakukan selama 28 hari.	*Stopwatch*	K = Kontrol K2, P1, P2, P3 = 3 jam.	Numerik
Histo-patologi pankreas	Gambaran histopatologi pankreas dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x dengan melihat perubahan morfologi pulau Langerhans dan kerusakan (nekrosis) jaringan pankreas.	Mikroskop cahaya	Derajat 0= morfologi normal Derajat 1= kerusakan ringan (kerusakan< 1/3 bagian) Derajat 2= kerusakan sedang (kerusakan 1/3 sampai 2/3 bagian) Derajat 3= kerusakan berat (kerusakan> 2/3 bagian) (Purmomo, 2010).	Ordinal

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 *Ethical Clearance*

Penelitian telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etika Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 1987/UN26/8/DT/2015 (Terlampir).

3.6.2 Pengadaan Hewan Coba

Pada penelitian hewan coba yaitu, tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan galur *Sprague dawley* sebanyak 25 ekor yang diperoleh dari Palembang Tikus *Centre* (PTC).

3.6.3 Adaptasi Hewan Coba

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

3.6.4 Pembagian Kelompok

Seluruh hewan coba dibagi secara *random* kedalam 5 kelompok percobaan Kelompok tikus yang tidak dipaparkan oleh gelombang elektromagnetik *handphone* dan tidak diberikan ekstrak manggis adalah kelompok kontrol 1 (K1), kelompok tikus yang dipaparkan oleh gelombang elektromagnetik *handphone* selama 3 jam adalah kelompok kontrol 2 tanpa diberi ekstrak kulit manggis dan diberi

NaCl 0,9% (K2), dan 3 kelompok perlakuan yang dipaparkan gelombang elektromagnetik selama 3 jam dalam 28 hari dan diikuti dengan pemberian ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis berturut–turut 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB (P1, P2 dan P3).

3.6.5 Prosedur Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Manggis

1. Determinasi buah manggis.

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

2. Pembuatan ekstrak etanol kulit buah manggis.

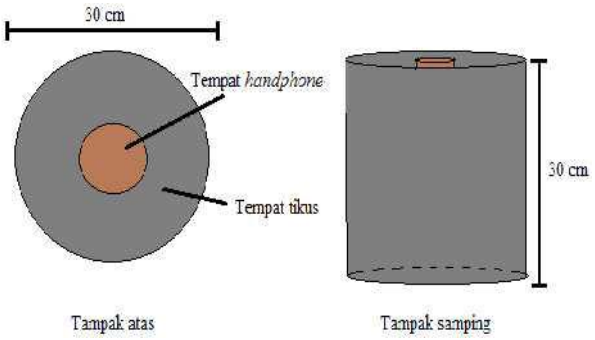
   Pembuatan ektrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) yang dilaksanakan di Laboratorium Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Kebun Raya Bogor Jawa Barat.

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 Prosedur Pemaparan Gelombang Elektromagnetik Handphone Terhadap Hewan Coba

Sebelum paparan, hewan coba dipindahkan sesuai dengan kelompoknya dari kandang pemeliharaan ke kandang modifikasi 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.



Gambar 12. Sketsa kandang tikus modifikasi (Sumber: Victorya, 2015).

Paparan gelombang elektromagnetik menggunakan *handphone* dilakukan dengan cara meletakan *handphone* dan melakukan panggilan telepon di tiap kandang tikus yang telah dimodifikasi. *Handphone* tersebut diaktifkan dan dibiarkan dalam keadaan *talk mode* selama 3 jam/hari pada kelompok K2, P1, P2, P3 (Meo *et al.*, 2010). 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 gelombang elektromagnetik *handphone* maupun ekstrak kulit manggis.

3.6.7 Prosedur Operasional Pembuatan Slide

Pembuatan preparat histopatologi menggunakan metode yang sudah ditetapkan Bagian Patologi Anatomi Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

1. *Fixation*

   Spesimen berupa potongan organ pankreas yang telah dipotong secara representatif kemudian segera difiksasi dengan formalin 10% selama 3 jam kemudian dicuci dengan air mengalir sebanyak 3−5 kali.

2. *Trimming*

   Organ dikecilkan hingga ukuran ±3 mm kemudian potongan organ pankreas tersebut lalu dimasukkan ke dalam *tissue cassette*.

3. Dehidrasi

   Keringkan air dengan meletakkan *tissue cassette* pada kertas tisu. dehidrasi dengan: alkohol 70% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol *xylol* 1:1 selama 0,5 jam.

4. *Clearing*

   Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan *xylol* I dan II, masing−masing selama 1 jam.

5. *Impregnasi*

Impregnasi dilakukan dengan menggunakan parafin selama 1 jam dalam oven suhu 65°C.

6. *Embedding*

Sisa parafin yang ada pada pan dibersihkan dengan memanaskan beberapa saat di atas api dan diusap dengan kapas. Parafin cair disiapkan dengan memasukkan parafin ke dalam cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu diatas 58°C. Kemudian Parafin cair dituangkan ke dalam *pan* lalu pindahkan satu persatu dari *tissue cassette* ke dasar pan dengan mengatur jarak yang satu dengan yang lainnya. *Pan* dimasukkan ke dalam air. Parafin yang berisi potongan pankreas dilepaskan dari *pan* dengan dimasukkan ke dalam suhu 4−6°C beberapa saat. Parafin dipotong sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan skalpel/pisau hangat. Lalu diletakkan pada balok kayu, diratakan pinggirnya, dan dibuat ujungnya sedikit meruncing. Memblok parafin, siap dipotong dengan mikrotom.

7. *Cutting*

Pemotongan dilakukan pada ruangan dingin. Sebelum memotong, blok didinginkan terlebih dahulu di lemari es. Dilakukan pemotongan kasar, lalu dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4−5 mikron. Pemotongan dilakukan menggunakan *rotary microtome* dengan *disposable knife*. Dipilih lembaran potongan yang paling baik, diapungkan pada air, dan

dihilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yan lain ditarik menggunakan kuas runcing. Lembaran jaringan dipindahkan ke dalam *water bath* suhu 60°C selama beberapa detik sampai mengembang sempurna. Dengan gerakan menyendok, lembaran jaringan tersebut diambil dengan *slide* bersih dan ditempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah. *Slide* yang berisi jaringan ditempatkan pada inkubator (suhu 37°C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

8. *Staining* atau pewarnaan dengan Harris Hematoksilin−Eosin

   Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, dipilih *slide* yang terbaik, selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia dibawah ini dengan waktu sebagai berikut:

   1) Dilakukan deparafinisasi dalam:

      a. Larutan *xylol* I selama 5 menit,

      b. Larutan *xylol* II selama 5 menit,

      c. *Ethanol* absolut selama 1 jam.

   2) Hidrasi dalam:

      a. Alkohol 96% selama 2 menit,

      b. Alkohol 70% selama 2 menit.

      c. Air selama 10 menit.

   3) Pulasan inti dibuat dengan menggunakan:

      a. Harris Hematoksilin selama 15 menit

      b. Dibilas dengan air mengalir,

c. Diwarnai dengan eosin selama maksimal 1 menit.

4) Selanjutnya, didehidrasi dengan menggunakan:

a. Alkohol 70% selama 2 menit,

b. Alkohol 96% selama 2 menit,

c. Alkohol absolut selama 2 menit.

5) Penjernihan dengan:

a. *Xylol* I selama 2 menit,

b. *X*ylol II selama 2 menit.

9. *Mounting* dengan entelan dan tutup dengan *deck glass*

   Setelah pewarnaan selesai, *slide* ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan *mounting*, yaitu entelan, dan ditutup dengan *deck glass*, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

10. S*lide* dibaca dengan mikroskop

    Slide diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Preparat histopatologi dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi untuk dikonsultasikan dengan ahli Patologi Anatomi. Pengamatan mikroskopis dilakukan oleh ahli patologi anatomi.

3.7 Pengolahan dan Analisis Data

3.7.1 Pengolahan Data

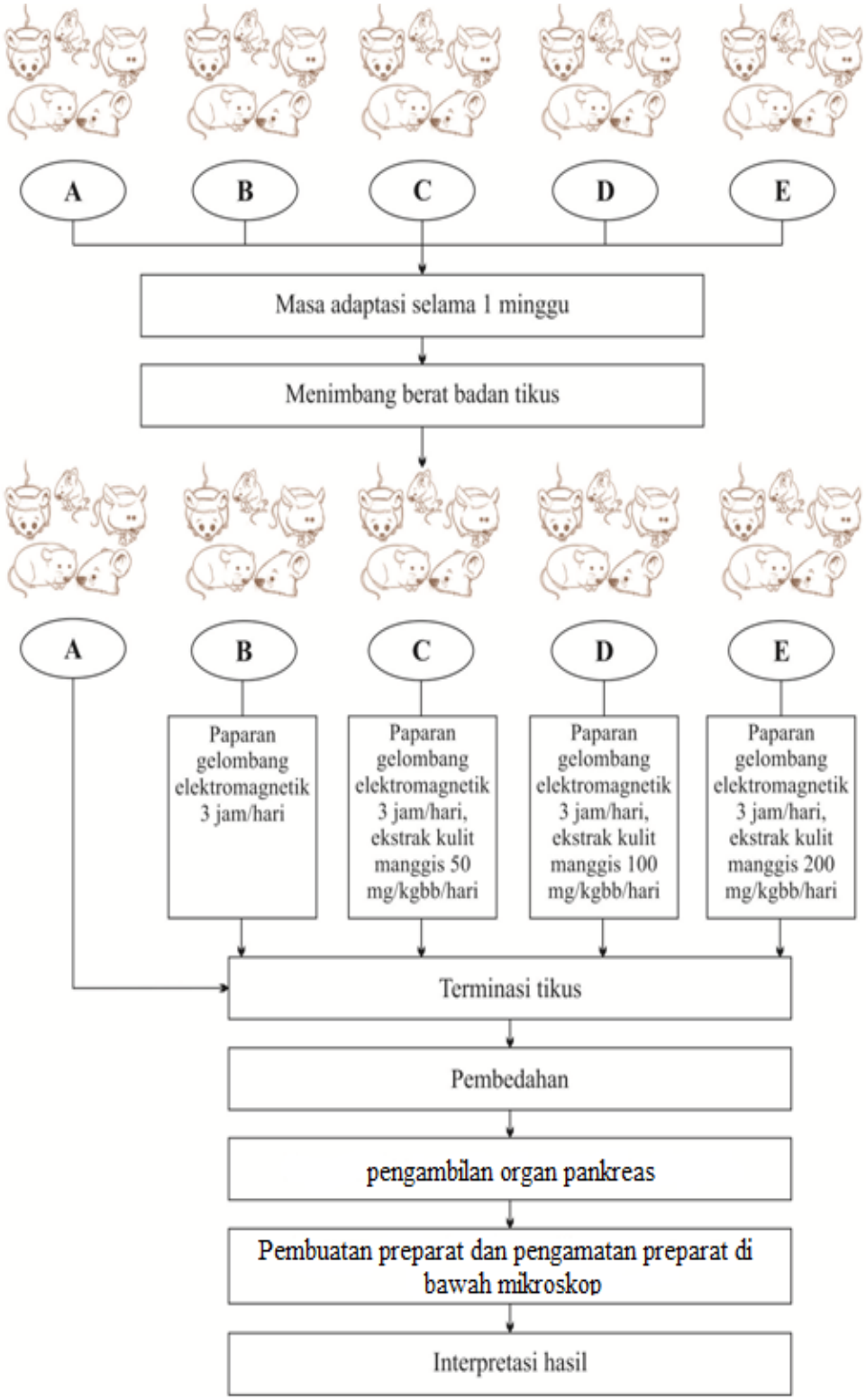
Data yang telah diperoleh dari proses pengumpulan data diubah kedalam bentuk table– tabel, kemudian proses pengolahan data menggunakan program komputer yang terdiri beberapa langkah, yang

pertama yaitu Koding atau mengkonversikan (menerjemahkan) data yang dikumpulkan selama penelitian kedalam simbol yang cocok untuk keperluan analisis. Kemudian lakukan *Data entry* atau memasukkan data kedalam komputer. Setelah itu lakukan Verifikasi yaitu memasukkan data pemeriksaan secara visual terhadap data yang telah dimasukkan kedalam komputer. Kemudian hasil yang telah dianalisis oleh komputer kemudian dicetak (*Output computer*).

3.7.2 Analisis Data

Hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan program analisis data. Untuk uji normalitas data dilakukan uji *Shapiro–Wilk* karena jumlah sampel <50 (p>0,05). Lalu dilakukan uji homogenitas dengan uji *Levene.* Karena varians data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen dilanjutkan dengan metode uji non parametrik *Kruskal–Wallis.*

3.8 Diagram Alur Penelitian



Gambar 13. Diagram alur penelitian