

III. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design* dan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan 18 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* yang dipilih secara acak dan dibagi menjadi 3 kelompok.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Perlakuan hewan coba dilakukan di *animal house* Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada bulan Oktober sampai November 2014. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Universitas Lampung.

3.3 Variabel Penelitian

Pada penelitian ini terdapat 3 variabel, yaitu variabel independen (variabel bebas), variabel dependen (variabel terikat), dan variabel perantara.

1. Variabel independen adalah paparan gelombang elektromagnetik.
2. Variabel dependen adalah jumlah dan motilitas spermatozoa tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*.
3. Variabel perantara dibagi menjadi 2:
 - a. Dapat dikendalikan:
 1. berat badan,
 2. makanan tikus,
 3. lingkungan tempat tinggal,
 4. kelembaban, dan
 5. jumlah waktu paparan.
 - b. Tidak dapat dikendalikan, yaitu respon tikus terhadap paparan.

3.4 Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Gelombang elektromagnetik	Paparan gelombang elektromagnetik berasal dari <i>handphone</i> <i>Blackberry Bellagio</i> (SAR 1,56 W/kg) dilakukan dengan cara meletakkan <i>handphone</i> di dalam kandang kemudian dibiarkan dalam kondisi <i>talk mode</i> sesuai dengan waktu perlakuan.	<i>Stopwatch</i>	K= Kontrol P1= 1 jam P2= 3 jam	Kategorik
Jumlah spermatozoa	Jumlah spermatozoa yang diperoleh dan dihitung di dalam kamar A, B, C, atau D hemositometer <i>Improved Neubauer</i> dengan perbesaran 100x dan kemudian hasilnya dimasukkan ke dalam rumus perhitungan spermatozoa/ml (Rahmanisa, 2013).	Hemositometer <i>Improved Neubauer</i> , kalkulator	Jumlah spermatozoa /ml	Numerik
Motilitas spermatozoa	Spermatozoa yang bergerak motil progresif maju ke depan dan disesuaikan dengan kriteria klasifikasi motilitas spermatozoa yang terdapat dalam lapang pandang yang diperiksa (Rahmanisa, 2013; Wasito, 2008).	Kriteria klasifikasi motilitas spermatozoa, kalkulator	Persentase spermatozoa motil progresif dibandingkan seluruh yang diamati (bergerak atau tidak bergerak)	Numerik

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

1. Kandang tikus
2. *Handphone Blackberry Bellagio* (SAR 1,56 W/kg)
3. Timbangan
4. Botol minuman
5. Tempat makan
6. Alat bedah minor
7. Alat untuk pembuatan preparat
8. Mikroskop cahaya
9. *Improved Neubauer*

3.5.2 Bahan

1. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dewasa galur *Sprague Dawley* usia 2-4 bulan dan sehat
2. Pakan tikus (pelet)
3. Larutan anestesi *ketamine*

3.6 Populasi dan Sampel Penelitian

3.6.1 Populasi Penelitian

Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* berumur 2-4 bulan dengan berat badan 200-300 gram yang diperoleh dari Institut Pertanian Bogor (IPB).

3.6.2 Sampel Penelitian

Rumus penentuan sampel untuk penelitian ini adalah Rumus Frederer 1967, yaitu: $t(n-1) = 15$, di mana t merupakan jumlah kelompok perlakuan dan n adalah jumlah pengulangan atau jumlah sampel setiap kelompok.

$$t(n-1) = 15$$

$$3(n-1) = 15$$

$$3n - 3 = 15$$

$$3n = 18$$

$$n = 6$$

Dari hasil di atas, sampel dibulatkan menjadi 6 ekor tikus putih.

3.6.3 Kelompok Perlakuan

1. Kelompok 1: kelompok tikus yang tidak dipapar oleh gelombang elektromagnetik *handphone Blackberry Bellagio* (SAR 1,56 W/kg) (kelompok kontrol).

2. Kelompok 2: kelompok tikus yang dipapar gelombang elektromagnetik *handphone Blackberry Bellagio* (SAR 1,56 W/kg) dengan durasi 1 jam per hari selama 21 hari (kelompok P1).
3. Kelompok 3: kelompok tikus yang dipapar gelombang elektromagnetik *handphone Blackberry Bellagio* (SAR 1,56 W/kg) dengan durasi 3 jam per hari selama 21 hari (kelompok P2).

3.6.4 Kriteria Inklusi

1. Sehat (rambut tidak tampak kusam, tidak rontok, dan bergerak aktif)
2. Jantan
3. Berat badan 200-300 gram
4. Usia 2-4 bulan

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 *Ethical Clearance*

Penelitian ini dimulai dengan pengajuan proposal *ethical clearance* untuk mendapatkan izin etik penelitian menggunakan 18 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan galur *Sprague Dawley*. Proposal diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.7.2 Pengadaan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* sebanyak 18 ekor yang diperoleh dari IPB.

3.7.3 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 pelet ayam serta minuman air *ad libitum*.

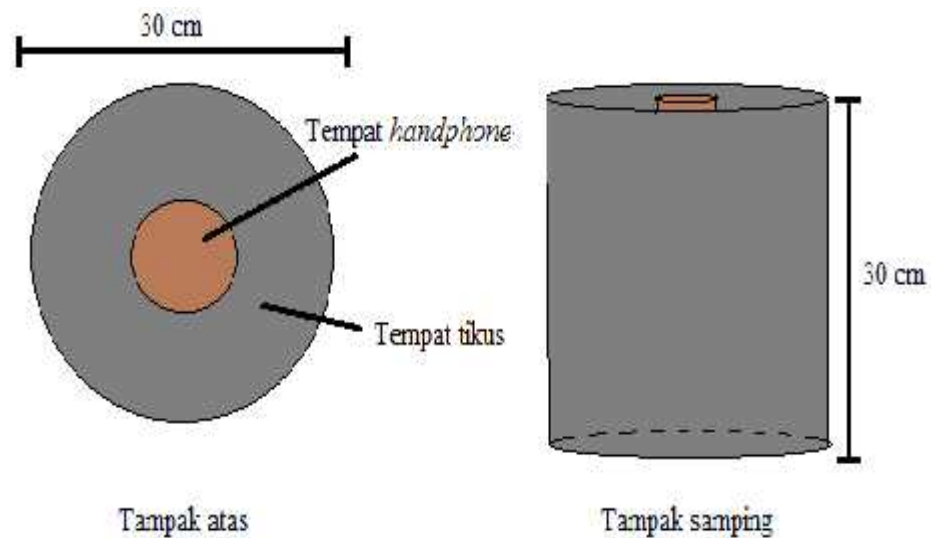
3.7.4 Pembagian Kelompok

Tabel 2. Pembagian Kelompok Perlakuan

Kelompok	Perlakuan
Kelompok K	Kelompok kontrol normal tanpa perlakuan paparan gelombang elektromagnetik
Kelompok P1	Kelompok perlakuan coba dengan pemberian paparan gelombang elektromagnetik <i>handphone Blackberry Bellagio</i> (SAR 1,56 W/kg) selama 1 jam/hari
Kelompok P2	Kelompok perlakuan coba dengan pemberian paparan gelombang elektromagnetik <i>handphone Blackberry Bellagio</i> (SAR 1,56 W/kg) selama 3 jam/hari

3.7.5 Perlakuan Paparan Gelombang Elektromagnetik *Handphone*

Paparan gelombang elektromagnetik menggunakan *handphone Blackberry Bellagio* (SAR 1,56 W/kg). Paparan gelombang elektromagnetik *handphone Blackberry Bellagio* (SAR 1,56 W/kg) 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. Tikus dimasukkan ke dalam kandang tanpa fiksasi gerakan dan diberikan paparan sesuai dengan kelompok perlakuan. *Handphone* tersebut kemudian dihubungi menggunakan telepon atau alat komunikasi lain. *Handphone* tersebut lalu diaktifkan dan dibiarkan dalam keadaan *talk mode* selama 1 jam/hari pada kelompok P1 (Mailankot, 2009) dan 3 jam/hari pada kelompok P2 (Almasiova, 2013). Pada kelompok K tidak diberi paparan. Perlakuan dimulai setiap pukul 09.00 setiap hari dan dijalankan selama 21 hari.



Gambar 7. Sketsa kandang tikus modifikasi untuk paparan

3.7.6 Prosedur Terminasi Hewan Coba

Setelah 21 hari, enam tikus jantan dari tiap kelompok akan dianestesi dengan menggunakan *ketamine* dosis $75-100 \text{ mg/kgBB} \pm 5-10 \text{ mg/kgBB}$ secara intraperitoneal dan ditunggu selama 10-30 menit. Kemudian tikus diterminasi dengan cara dislokasi servikal. Setelah dilakukan terminasi dan pengamatan pada organ yang diteliti, tikus dimusnahkan dengan menggunakan metode pembakaran pada tempat yang telah tersedia dengan tungku pembakaran menggunakan bahan bakar solar. Hewan coba dibakar secara bertahap hingga menjadi abu.

3.7.7 Prosedur Pengamatan Jumlah dan Motilitas Spermatozoa Tikus

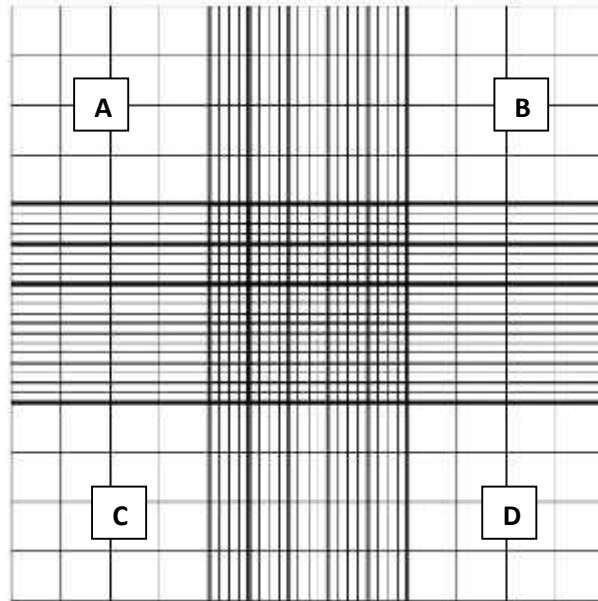
Setelah tikus diterminasi, dilakukan pengamatan sebagai berikut:

1. Jumlah Spermatozoa

Suspensi spermatozoa yang telah diperoleh terlebih dahulu dihomogenkan dengan NaCl 0,9%, selanjutnya diambil sebanyak 10 μ l sampel dan dimasukkan ke dalam kotak-kotak hemositometer *Improved Neubauer* serta ditutup dengan kaca penutup. Di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 kali, hemositometer diletakkan dan dihitung jumlah spermatozoa pada kotak atau bidang A, B, C, atau D. Hasil perhitungan jumlah spermatozoa kemudian dimasukkan ke dalam rumus penentuan jumlah spermatozoa/ml suspensi sekresi kauda epididimis sebagai berikut:

$$\text{Jumlah spermatozoa} = (n/0,1) \times \text{pengenceran} \times 10^3 \text{ juta/ml}$$

di mana n = jumlah spermatozoa yang dihitung pada kotak A, B, C, atau D (Gandasoebrata dalam Rahmanisa, 2013).



Gambar 8. Kamar hitung hemositomer *Improved Neubauer* (Anonim, 2010)

2. Motilitas Spermatozoa

Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan metode Partodihardjo (Rahmanisa, 2013). Untuk menentukan motilitas spermatozoa, diambil spermatozoa dari kauda epididimis seperti penjelasan di atas kurang lebih 10-15 μl 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%.

$$\% \text{ motilitas} = \frac{\text{jumlah spermatozoa progresif}}{\text{total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Untuk menentukan motilitas spermatozoa, juga dapat menggunakan metode lain dengan mengambil spermatozoa dari kauda epididimis seperti penjelasan di atas kurang lebih 10-15 μ l ke atas gelas objek lalu ditutup dengan kaca penutup. Perhitungan dilakukan pada lima lapang pandang pada pembesaran mikroskop 400x.

Kategori yang dipakai untuk mengklasifikasikan motilitas spermatozoa menurut WHO:

1. Kelas A : berenang cepat dan lurus
2. Kelas B : berenang lambat
3. Kelas C : bergerak di tempat
4. Kelas D : tidak bergerak sama sekali

Biasanya empat sampai enam lapang pandang diperiksa untuk memperoleh seratus spermatozoa secara berurutan yang kemudian diklasifikasi sehingga menghasilkan presentase setiap kategori motilitas (Wasito, 2008).

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

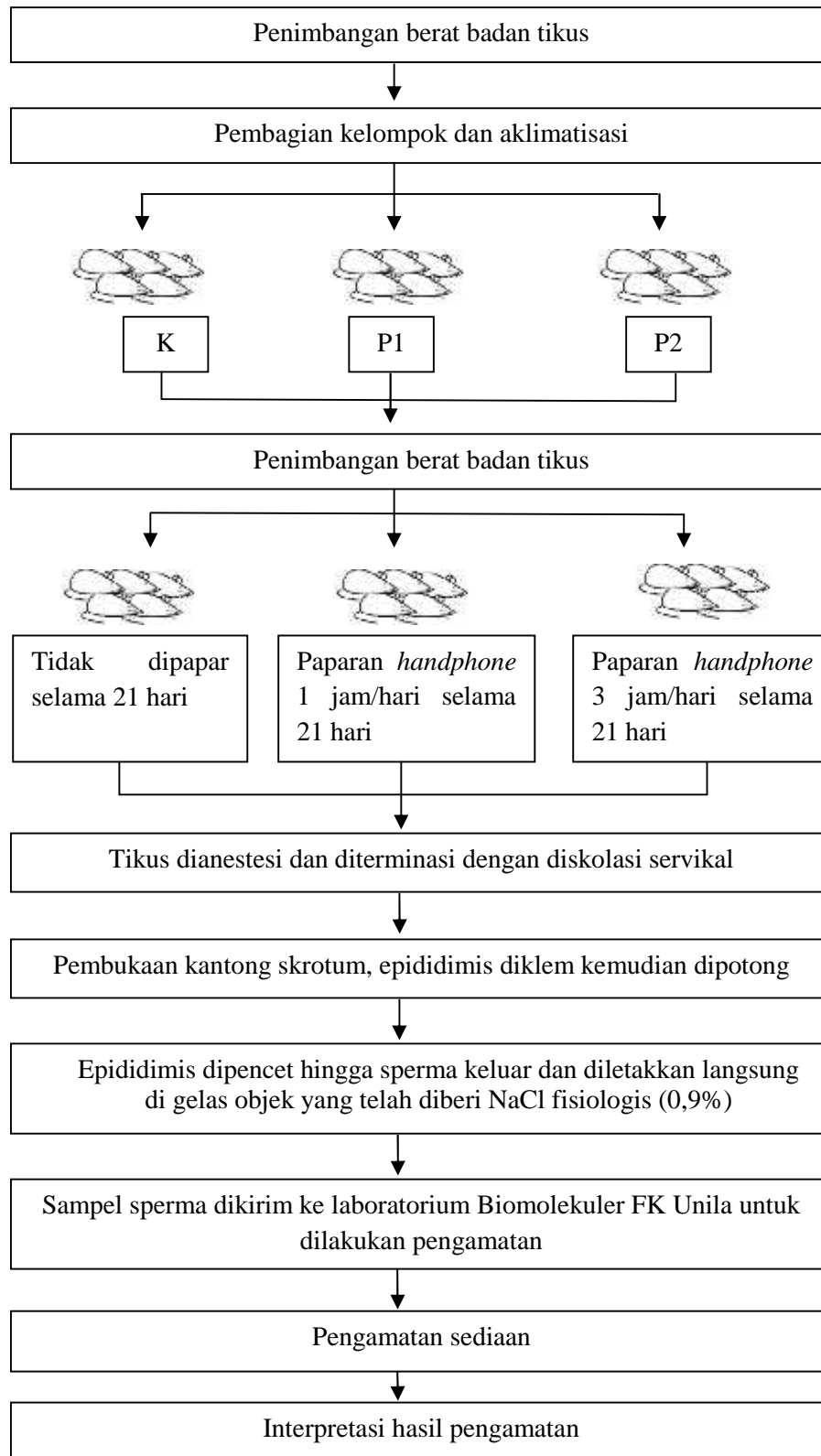
1. Koding, untuk mengkonversikan (menerjemahkan) data yang dikumpulkan selama penelitian ke dalam simbol yang cocok untuk keperluan analisis.
2. *Data entry*, memasukkan data ke dalam komputer.
3. Verifikasi, memasukkan data pemeriksaan secara visual terhadap data yang telah dimasukkan ke dalam komputer.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

3.10 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.

3.11 Diagram Alur Penelitian



Gambar 9. Diagram alur penelitian

3.12 *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 $t(n-1) = 15$, 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 6 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).