

III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design*.. Penelitian ini menggunakan 18 ekor tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* berumur 2-4 bulan dengan berat badan 200-300 gram yang dipilih secara random dan dibagi menjadi 3 kelompok.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Perlakuan dan pengujian kecemasan hewan coba dilakukan di *Animal House* Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pengukuran aktifitas enzim katalase hewan coba dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober-November 2014.

C. Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan oleh penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel bebas (*independent variable*) adalah paparan kronik gelombang elektromagnetik ponsel.

2. Variabel terikat (*dependent variable*) adalah nilai kecemasan dan aktifitas enzim katalase hewan coba.
3. Variabel perantara terbagi dalam dua variabel, yaitu variabel perantara terkontrol, dan variabel perantara tidak terkontrol. Variabel perantara terkontrol diantaranya yaitu :
 - Usia : 2-4 bulan
 - Jenis kelamin : jantan
 - Berat badan : 200-300g
 - Makanan dan minuman
 - Lingkungan kandang

Variabel perantara yang tidak terkontrol yaitu efek hormonal dan respon tikus terhadap paparan gelombang elektromagnetik yang diberikan.

D. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Jenis Variabel
1.	Gelombang elektromagnetik	Paparan kronik gelombang elektromagnetik yang berasal dari ponsel <i>Blackberry</i> (SAR 1,56W/kg) dengan waktu paparan 0, 1 dan 3 jam perhari selama 21 hari	Numerik
2.	Nilai kecemasan	Nilai kecemasan yang diuji dengan <i>Elevated Plus Maze Test</i> (EPM) yang terdiri dari lengan terbuka (<i>open arm</i>) dan lengan tertutup (<i>closed arm</i>) setelah dipaparkan gelombang elektromagnetik ponsel. Peningkatan nilai kecemasan dilihat dengan penurunan jumlah lengan EPM terbuka yang dimasuki dan durasi pada lengan EPM terbuka	Numerik
3.	Aktifitas enzim katalase	Aktifitas enzim katalase yang diukur dengan alat spektrofotometer setelah dipaparkan gelombang elektromagnetik ponsel	Numerik

E. Populasi dan Sampel

1. Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* dewasa, berumur 2-4 bulan, dengan berat badan 200-300 gram yang diperoleh dari Institut Pertanian Bogor (IPB).

2. Sampel Penelitian

Jumlah sampel berdasarkan kriteria sampel WHO yaitu minimal 5 ekor. Sampel penelitian yang digunakan sebanyak 18 ekor yang dipilih secara random dan dibagi dalam 3 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri 6 ekor tikus. Penentuan besar sampel ditentukan dengan menggunakan rumus Frederer (Srigandono, 1981):

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

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

$$3n - 3 = 15$$

$$3n = 18$$

$$n = 6$$

Keterangan :

n : Jumlah sample tiap kelompok

t : Jumlah kelompok

Dari hasil diatas, sampel yang digunakan pada tiap kelompok sebanyak 6 ekor tikus putih. Total sample yang digunakan sebanyak 18 ekor tikus putih.

Untuk mengantisipasi hilangnya unit eksperimen maka dilakukan koreksi untuk tikus yang hilang atau *dropout* dengan $\frac{1}{(1-F)}$ dimana F adalah proporsi unit eksperimen yang *dropout* 10%.

$$\frac{1}{(1-F)} = \frac{1}{1-0,6} = \frac{1}{0,4} = 3 \text{ ekor}$$

3. Kelompok Perlakuan

1. Kelompok 1 : Kelompok tikus yang tidak dipajankan oleh gelombang elektromagnetik ponsel (Kelompok Kontrol).
2. Kelompok 2 : Kelompok tikus yang dipajankan gelombang elektromagnetik ponsel selama 1 jam per hari selama 21 hari (Kelompok P1).
3. Kelompok 3 : Kelompok tikus yang dipajankan gelombang elektromagnetik ponsel selama 3 jam per hari selama 21 hari (Kelompok P2).

4. Kriteria Inklusi dan Kriteria Eksklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini yaitu;

1. Tikus putih galur *Sprague dawley*
2. Jenis kelamin jantan
3. Berat badan 200-300g
4. Usia 2-4 bulan
5. Kondisi sehat (aktif, tidak cacat)

Kriteria eksklusi pada penelitian ini yaitu;

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

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

- Kandang Tikus
- Ponsel *Blackberry* (SAR 1,56 W/kg)
- Timbangan elektronik
- Kandang hewan coba
- Kandang modifikasi perlakuan
- Tempat pakan hewan dan tempat minum hewan
- *Elevated Plus Maze* yang terdiri dari lengan terbuka (*open arm*) dan lengan tertutup (*close arm*)
- *Stopwatch*
- Kamera dan *lazy pod*
- Tabung reaksi+EDTA
- Spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm.
- Sduit 1cc

- Handschoen, kapas, dan alkohol
- Mikropipet
- Mikrotube
- Alat vortex
- Pipet tetes
- Tabung reaksi
- Gelas ukur

2. Bahan Penelitian

- Larutan H₂O₂ 30% BJ 1.11 kg/l dengan pengenceran 1:4000 dalam akuabides, molaritas 27,2 μ M.
- NaCl 0,9%
- Bufer fosfat salin (PBS) pH 7,4
- Aquabidestilata



Gambar 3.1 Kandang Modifikasi Perlakuan (Ghanbari, 2012)

G. Prosedur Penelitian

1. *Ethical Clearence*

Penelitian ini dimulai dengan pengajuan proposal *ethical clearence* untuk mendapatkan izin etik penelitian menggunakan 18 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan galur *Sprague dawley*.

2. Pengadaan Hewan Coba

Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan galur *Sprague dawley* sebanyak 18 ekor yang diperoleh dari Institut Pertanian Bogor (IPB).

3. Aklimatisasi dan Pembagian kelompok

Penelitian ini menggunakan 18 ekor tikus putih yang dibagi secara random kedalam 3 kelompok percobaan. Dilakukan penimbangan berat sebelum aklimatisasi selama 1 minggu. Penimbangan berat badan dilakukan kembali setelah masa adaptasi dan selama perlakuan.

Kelompok percobaan pertama tidak dipaparkan oleh gelombang elektromagnetik dari ponsel. Kelompok ini adalah kelompok kontrol. Setelah 21 hari dinilai kecemasannya dengan menggunakan *elevated plus maze* dan aktifitas enzim katalase dengan spektrofotometer.

Kelompok percobaan kedua dipaparkan dengan gelombang elektromagnetik dari ponsel *Blackberry* (SAR 1,56W/kg) selama 1 jam/hari (Mailankot, 2009). Setelah 21 hari dinilai kecemasannya dengan menggunakan *elevated plus maze* dan aktifitas enzim katalase dengan spektrofotometer.

Kelompok percobaan ketiga dipaparkan dengan gelombang elektromagnetik dari ponsel *Blackberry* (SAR 1,56W/kg) selama 3 jam/hari (Almasiova, 2013). Setelah 21 hari dinilai kecemasannya dengan *elevated plus maze* dan aktivitas enzim katalase dengan spektrofotometer.

4. Prosedur Perlakuan Hewan Coba

a. Prosedur Pemaparan gelombang elektromagnetik

Pemaparan gelombang elektromagnetik ponsel *Blackberry* (SAR 1,56W/kg) dilakukan dengan menggunakan kandang modifikasi khusus untuk pemaparan. Ponsel *Blackberry* (SAR 1,56W/kg) diletakkan ditengah-tengah kandang yang mempunyai tempat khusus ponsel. Hewan coba dipindahkan dari kandang pemeliharaan ke kandang modifikasi sesuai dengan kelompoknya. Saat pemaparan, ponsel dibuat dalam keadaan menerima panggilan telepon selama 1 jam untuk kelompok perlakuan kedua dan 3 jam untuk kelompok perlakuan ketiga. Paparan tersebut dilakukan setiap hari pada pagi hari mulai dari pukul 09.00 WIB hingga pukul 12.00 WIB selama 21 hari pemaparan. Setelah pemaparan selesai, hewan coba dipindahkan kembali ke kandang pemeliharaan sesuai kelompoknya.

b. Prosedur Pengujian Kecemasan dengan *Elevated Plus Maze*

Pengujian kecemasan pada hewan coba menggunakan sebuah labirin uji setinggi 50 cm dari lantai, berbentuk “tanda tambah” dengan 2 lengan terbuka (50x10 cm) dan 2 lengan tertutup (50x10x40 cm), yang disebut *Elevated Plus Maze* (EPM). EPM sebagai alat uji nilai kecemasan dengan empat lengan dimana lengan terbuka mewakili

lingkungan yang berbahaya dan berisiko (terbuka dan ketinggian) bagi tikus dan lengan tertutup mewakili lingkungan yang aman (gelap dan tertutup) untuk bersembunyi bagi tikus. Alat uji ini menunjukkan perilaku tikus yang menyukai tempat yang aman untuk bersembunyi (lengan tertutup) dan perilaku tikus yang ingin mengeksplorasi tempat baru dan berbahaya.

Setiap hewan coba akan diletakkan di pusat labirin dan dibiarkan berjalan-jalan di labirin tersebut selama 5 menit. Setiap kali pergantian hewan coba, labirin dibersihkan dengan alkohol untuk menghilangkan bau dan jejak hewan coba sebelumnya dan untuk menghindari bias karena faktor olfaktori. Setelah selesai tikus dikembalikan pada kandangnya.

Data yang perlu diamati saat pengujian dengan EPM yaitu durasi saat berada pada masing-masing lengan EPM dan jumlah lengan terbuka atau tertutup yang dimasuki tikus yang selanjutnya disajikan sebagai rasio jumlah lengan EPM terbuka yang dimasuki/durasi total pada lengan EPM terbuka terhadap total jumlah lengan EPM yang dimasuki/durasi total selama satu sesi pengamatan yaitu 5 menit atau 300 detik. Prinsip penilaian pada EPM ini semakin cemas tikus maka semakin sedikit keinginan untuk mengeksplorasi tempat-tempat yang tidak aman dan berisiko, atau dengan kata lain semakin sedikit waktu yang digunakan pada lengan terbuka atau semakin jarang memasuki lengan terbuka menunjukkan bahwa tikus menunjukkan perilaku kecemasan dengan lebih memilih tempat gelap dan tertutup sebagai

tempat yang aman untuk bersembunyi. Sebaliknya, semakin lama tikus menghabiskan waktunya untuk mengeksplorasi tempat berbahaya dan berisiko pada lengan terbuka maka semakin rendah nilai kecemasannya (Walf dan Frye, 2007; Komada,dkk.,2008).



Gambar 3.2 *Elevated Plus Maze* (Leo dan Pamplona, 2014)

c. Prosedur Pengambilan Sampel Darah Tikus

Setelah pengujian terhadap kecemasan dengan *Elevated Plus Maze*, dilakukan pengukuran aktivitas enzim katalase tikus. Tikus dianestesi dengan ketamine 75-100 mg/kg secara intraperitoneal kemudian tikus diterminasi berdasarkan *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) menggunakan metode dekapitasi leher dengan cara meletakkan tikus pada permukaan yang rata, kemudian sebuah pinset diletakkan diatas kuduk tikus dan pinset ditekan sambil menarik ekor tikus dengan kuat dan pinset diarahkan ke atas kepala tikus (AVMA, 2013). Setelah tikus dipastikan mati, darah diambil melalui jantung dengan menggunakan alat suntik sebanyak ± 1 cc,

kemudian langsung dimasukkan kedalam tabung reaksi+EDTA. Tikus kemudian dimusnahkan dengan cara dibakar.

d. **Prosedur Pengukuran Aktivitas Enzim Katalase**

Pengukuran aktivitas katalase pada penelitian ini dilakukan dengan cara mensentrifugasi 1 ml darah selama 10 menit dengan kecepatan 1400 rpm. Lalu sel darah merah tersebut dicuci sebanyak 3 kali dengan NaCl 0,9% dan dipecah dengan diberikan aquades dingin (perbandingan 1 : 4). Hemolisat yang dihasilkan digunakan untuk menetapkan aktivitas katalase. Hemolisat kemudian diencerkan 100x dengan larutan buffer fosfat salin (PBS) pH 7,4. Pembuatan larutan uji (sampel) dilakukan dengan menambahkan 25 µl hemolisat yang telah diencerkan dengan PBS ke dalam 975 µl larutan H₂O₂ dalam mikrotube yang selanjutnya dilakukan pem-vortek-an selama 1 menit untuk menghomogenkan larutan. Pembuatan larutan blanko dilakukan dengan menambahkan 25 µl larutan PBS pH 7,4 ke dalam 975 µl larutan H₂O₂ dalam mikrotube yang selanjutnya dilakukan pem-vortek-an selama 1 menit untuk menghomogenkan larutan. Selanjutnya, kedua larutan tersebut (uji dan blanko) diukur serapannya dengan spektrofotometer pada $\lambda = 260$ nm pada menit ke-1. Kemudian diukur kembali serapannya pada $\lambda = 260$ nm pada menit ke-2. Selanjutnya aktivitas enzim katalase (Unit/mL) dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut.

$$\frac{(\text{Selisih Serapan Uji} - \text{Selisih Serapan Blanko}) / \text{Selisih Waktu}}{\text{Molaritas H}_2\text{O}_2 \times \text{Volume sampel}} \times \text{Faktor Pengenceran}$$

H. Pengumpulan, Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan data primer yaitu data yang diambil langsung dari subjek penelitian. Pengumpulan data nilai kecemasan diperoleh dengan bantuan rekaman kamera video untuk menghindari pengamatan yang tidak tepat. Data nilai kecemasan pada penelitian ini dinyatakan dalam angka berupa nilai rata-rata dari durasi pada lengan EPM terbuka dan tertutup yang dinyatakan dalam detik dan rata-rata dari jumlah lengan EPM terbuka dan tertutup yang dimasuki hewan coba. Selanjutnya nilai kecemasan hewan coba dilihat berdasarkan rasio atau perbandingan antara jumlah lengan EPM terbuka yang dimasuki atau durasi total pada lengan EPM terbuka terhadap total jumlah lengan EPM yang dimasuki atau durasi total selama satu sesi pengamatan. Aktivitas enzim katalase pada penelitian ini dinyatakan dalam angka berupa nilai rata-rata aktivitas enzim katalase pada spektrofotometer.

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.

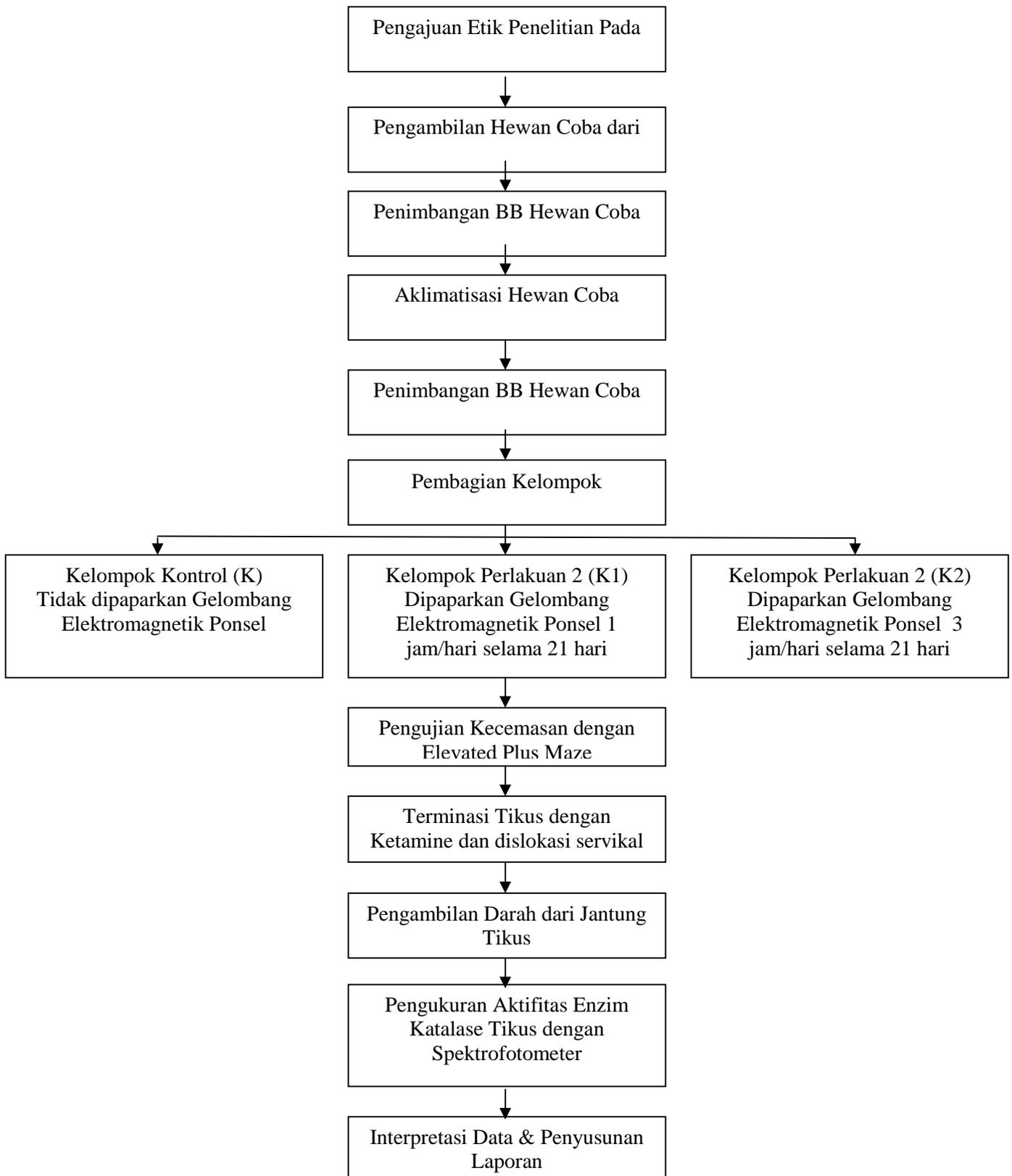
3. Verifikasi, memasukkan data pemeriksaan secara visual terhadap data yang telah dimasukkan kedalam komputer.
4. *Output* komputer, hasil yang telah dianalisis oleh komputer kemudian dicetak.

3. Analisis Data

Analisis statistika 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 statististik.

Hasil penelitian dianalisis dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel 50 dan kemudian dilakukan uji varians *Levene's*. Data yang diperoleh memiliki distribusi normal dan varians data sama dimana pada masing-masing uji didapatkan $p > 0,05$, sehingga dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way ANOVA*. Hipotesis dianggap bermakna bila $p < 0,05$. Jika pada uji *ANOVA* menghasilkan $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan melakukan uji *Post-hoc* LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan. Pada nilai kecemasan dengan aktivitas enzim katalase dianalisis korelasinya dengan uji korelasi *Pearson*.

I. Diagram Alur Penelitian



Gambar 3.3 Bagan Alur Penelitian

J. Etika Penelitian

Penelitian ini telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan 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 yaitu $(n-1)(t-1) = 15$, 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.
 - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
 - b. Bebas dari ketidak-nyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 3-4 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas

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

- c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan, pada penelitian hewan coba diberikan perlakuan dengan menggunakan *nasogastric tube* dilakukan dengan mengurangi rasa nyeri sesedikit mungkin, dosis perlakuan diberikan berdasarkan pengalaman terdahulu maupun literatur yang telah ada.

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 sesuai dengan IACUC (Ridwan, 2013).