

## BAB IV

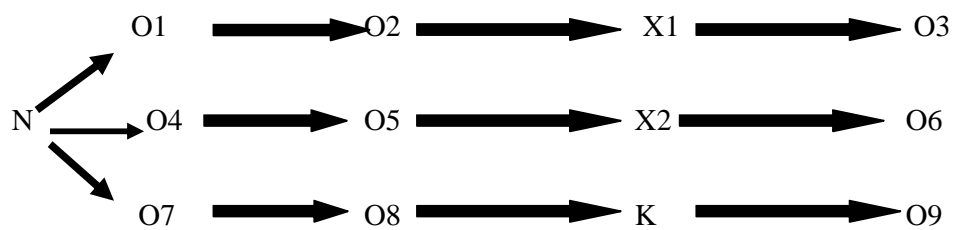
### METODOLOGI PENELITIAN

#### 4.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian dibidang Farmakologi dan Terapi.

#### 4.2 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental laboratorik menggunakan *Pre and Post Test Control Group Design* pada 3 kelompok hewan coba tikus Wistar dengan rancangan penelitian seperti diuraikan pada **Gambar 9**. dibawah ini :



**Gambar 9.** Rancang Bangun Penelitian

Keterangan :

N = Besar sampel penelitian

X1 = Kelompok perlakuan yang diberi MSG merek A yang dijual di pasaran dengan mencantumkan kadar monosodium glutamat sebesar 99% yang diberikan secara per oral dosis 5 mg / kgBB / hari

X2 = Kelompok perlakuan yang diberi MSG merek B yang dijual di pasaran tanpa mencantumkan kadar monosodium glutamat yang diberikan secara per oral dosis 5mg / kgBB / hari

K = Kelompok Kontrol

O1 = Evaluasi awal fungsi memori spasial pada kelompok pemberian MSG merek A yang dijual di pasaran dengan mencantumkan kadar monosodium glutamat sebesar 99% yang diberikan secara per oral dosis 5 mg / kgBB / hari

O2 = Evaluasi fungsi memori spasial sebelum perlakuan ( sesuai proses pengadaptasian alat ) pada kelompok pemberian MSG merek A yang dijual di pasaran dengan mencantumkan kadar monosodium glutamat sebesar 99% yang diberikan secara per oral dosis 5 mg / kgBB / hari

O3 = Evaluasi fungsi memori spasial pada 3 minggu setelah perlakuan pada kelompok pemberian MSG merek A yang dijual di pasaran dengan mencantumkan kadar monosodium glutamat sebesar 99% yang diberikan secara per oral dosis 5 mg / kgBB / hari

O4 = Evaluasi awal fungsi memori spasial pada kelompok pemberian MSG merek B yang dijual di pasaran tanpa mencantumkan kadar monosodium glutamat yang diberikan secara per oral dosis 5 mg / kgBB / hari

O5 = Evaluasi fungsi memori spasial sebelum perlakuan ( sesuai proses pengadaptasian alat ) pada kelompok pemberian MSG merek B yang dijual di pasaran tanpa mencantumkan kadar monosodium glutamat yang diberikan secara per oral dosis 5 mg / kgBB / hari

O6 = Evaluasi fungsi memori spasial pada 3 minggu setelah perlakuan pada kelompok pemberian MSG merek B yang dijual di pasaran tanpa mencantumkan kadar monosodium glutamat yang diberikan secara per oral dosis 5 mg / kgBB / hari

O7 = Evaluasi awal fungsi memori spasial pada kelompok kontrol

O8 = fungsi memori spasial sebelum perlakuan pada kelompok kontrol

O9 = Evaluasi fungsi memori spasial pada 3 minggu setelah perlakuan pada kelompok kontrol

### **4.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dengan tikus Wistar berlangsung selama tiga minggu 26 Mei 2014 – 21 Mei 2014. Pemeliharaan hewan coba dan pemberian MSG per oral merek A yang dijual di pasaran dengan mencantumkan kadar monosodium glutamat sebesar 99% dan merek B yang dijual di pasaran tanpa mencantumkan kadar monosodium glutamat dilaksanakan di laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

### **4.4 Populasi dan Sampel**

Populasi penelitian yang akan dilaksanakan memakai tikus Wistar jantan berusia 8 minggu dengan berat 200 gram. Berkenaan dengan alasan pemilihan jenis Wistar dikarenakan dalam beberapa penelitian sebelumnya oleh peneliti – peneliti lain memberikan hasil pada memori spasial. Besar sampel yang digunakan menurut *World Health Organization* ( WHO ) adalah 5 ekor <sup>78</sup>, sehingga pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 15 ekor , tiap kelompok masing masing berisi 5 ekor. Sedangkan untuk mengantisipasi dikeluarkannya tikus akibat adanya kriteria drop out, maka pada tiap kelompok akan ditambahkan satu ekor tikus sehingga jumlah sampel yang digunakan adalah sebesar 18 ekor.

Randomisasi : 18 tikus Wistar dikelompokkan secara random menjadi 3 kelompok yaitu :

Kelompok Kontrol : 5 ekor tikus + 1 ekor tikus sebagai cadangan

Kelompok Perlakuan 1 : 5 ekor tikus + 1 ekor tikus sebagai cadangan

Kelompok Perlakuan 2 : 5 ekor tikus + 1 ekor tikus sebagai cadangan

#### **4.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi**

##### **3.4.1. Kriteria Inklusi**

- Tikus Wistar jantan usia 8 minggu dengan bobot badan 200 gram
- Aktifitas tingkah laku normal

##### **3.4.2. Kriteria Eksklusi**

- Tikus Wistar yang mengalami stress : mutisme, agresif

#### **4.6 Kriteria Drop Out**

- Tikus yang menderita sakit ( diare ) selama penelitian
- Bobot tikus yang menurun hingga kurang dari 200 gram
- Tikus mati selama percobaan berlangsung

## **4.7 Variabel data**

### **4.7.1. Variabel Bebas**

Variable bebas pada penelitian ini adalah berupa pemberian monosodium glutamat merek A yang dijual di pasaran dengan mencantumkan kadar monosodium glutamat sebesar 99% diberikan secara per oral dengan dosis 5 mg / kgBB / hari dan pemberian monosodium glutamat merek B yang dijual di pasaran tanpa mencantumkan kadar monosodium glutamat diberikan secara per oral dengan dosis 5 mg / kgBB / hari dan akan dilakukan penelitian selama 3 minggu

### **4.7.2. Variabel Tergantung**

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah fungsi memori spasial yang dinilai dengan perangkat *Morris Water Maze* (MWM)

### 4.7.3. Definisi Operasional

**Tabel 4.** Definisi Operasional Variabel

No	Nama Variabel	Batasan	Instrumen	Skala
1	Pemberian monosodium glutamat per oral	Pemberian monosodium glutamat peroral merk A yang dijual di pasaran dengan mencantumkan kadar monosodium glutamat sebesar 99% dengan dosis 5 mg / KgBB / hari dan monosodium glutamat per oral merk B yang dijual di pasaran tanpa mencantumkan kadar monosodium glutamat dengan dosis 5 mg / KgBB / hari	Timbangan elektrik	Skala Nominal
2	Fungsi Memori Spasial	Kemampuan untuk menentukan arah dan tujuan dinilai menggunakan alat <i>Morris Water Maze</i> dengan menghitung lama waktu tempuh ( detik ) dari lima rute yang ditentukan	<i>Morris Water Maze</i>	Skala Rasio

## 4.8 Alat dan Bahan

### 4.8.1. Alat

Alat-alat yang diperlukan pada saat penelitian adalah kandang hewan, timbangan elektronik, sonde lambung, alat *Morris Water Maze* ( modifikasi ). Morris ( 1981 ) ; Morris, Garrud, Rwalins dan O'Keefe ( 1982 ) memberi pendapat bahwa *Morris Water Maze* adalah alat yang baik dan juga populer untuk memeriksa status memori spasial dari tikus. Dengan alat ini, tikus memperoleh

keterampilan yang dapat digunakan untuk menjalankan tugasnya, yaitu : berenang, berenang menjauhi dinding bejana, menemukan tujuan untuk istirahat serta memanjat untuk mencapai bagian atas. Selain itu tikus juga dapat belajar untuk menentukan arah yang tepat serta menemukan landasan yang tersembunyi sehingga menurut D'Hooge dan De Deyn ( 2001 ) bahwa *Morris Water Maze* merupakan alat yang baik untuk menilai fungsi belajar dan fungsi mengingat pada hewan coba tikus.<sup>29,31</sup>

Perangkat *Morris Water Maze* yang digunakan pada percobaan mempunyai dimensi ruang berupa : dasar Maze yang berbentuk lingkaran dengan diameter 160 cm, dibagi menjadi delapan kuadran ( kuadran satu sampai delapan ), tinggi 45 cm, diisi air sampai setinggi 35 cm dengan suhu air yang disesuaikan dengan suhu kamar. Landasan yang digunakan oleh hewan coba tikus terbuat dari kaca tembus pandang berdimensi alas dan atap 10 x 10 cm, tinggi 34 cm dan tebal kaca 0,8 cm serta permukaan landasan kaca terletak 1 cm dibawah permukaan air dan diletakkan pada kuadran nomor lima.<sup>79</sup>

Kandang tikus pada percobaan ini menyesuaikan pada kaidah kebutuhan ruang setiap ekor tikus jantan dengan berat 200 gram akan memerlukan area seluas 450 cm<sup>2</sup> untuk melakukan aktifitasnya dan tinggi maksimal saat tikus berdiri pada kedua tungkai belakang adalah 30 cm. Kandang tikus berjumlah 4 buah dengan rincian : tiga buah kandang untuk ke tiga macam kelompok penelitian sedangkan satu kandang sebagai tempat transit setelah melakukan tes *Morris Water Maze* sebelum dimasukkan ke dalam kandang. Sedangkan untuk kandangnya akan diletakkan pada ruangan dengan penerangan berupa lampu



antara 20 – 30 lux yang menyala selama dua belas jam dimulai pada pukul 18.00 hingga 06.00 dan pada dua belas jam selanjutnya pada pukul 06.00 hingga 18.00 lampu akan dimatikan.<sup>79</sup>

#### **4.8.2. Bahan**

- a. Tikus Wistar jantan yang diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Coba Laboratorium Biologi ( FMIPA ) Universitas Negeri Semarang dan untuk memenuhi kriteria inklusi, maka diberikan pakan standar BR – 2 dan minum secara *ad libitum*. Selama waktu penelitian hewan coba tikus akan ditempatkan pada tiga kandang terpisah sesuai dengan kelompok penelitian ( P1, P2, dan P3 )
- b. Monosodium glutamat per oral merek A yang dijual di pasaran dengan mencantumkan kadar monosodium glutamat sebesar 99% dengan dosis 5 mg / KgBB / hari dan monosodium glutamat per oral merek B yang dijual di pasaran tanpa mencantumkan kadar monosodium glutamat dengan dosis 5 mg / kgBB / hari diberikan selama tiga minggu.

## **4.9 Alur Penelitian**

### **4.9.1. Pembagian Kelompok**

Sampel penelitian dibagi menjadi tiga kelompok yang pada masing-masing kelompok terdiri atas enam ekor tikus dan dimasukkan dalam tiga buah kandang yang berbeda sesuai dengan kelompok penelitian hingga penelitian berakhir. Kelompok K ( P1 ) merupakan tikus kontrol yang tidak diberi paparan monosodium glutamat, Kelompok I ( P2 ) merupakan kelompok tikus yang diberi paparan monosodium glutamat per oral merek A yang dijual di pasaran dengan mencantumkan kadar monosodium glutamat sebesar 99% dengan dosis 5 mg / KgBB / hari satu kali sehari dan Kelompok II ( P3 ) merupakan kelompok tikus yang diberi paparan monosodium glutamat per oral merek B yang dijual di pasaran tanpa mencantumkan kadar monosodium glutamat dengan dosis 5 mg / KgBB / hari satu kali sehari, dengan waktu perlakuan masing masing selama tiga minggu.

### **4.9.2. Pengenalan Metode Pemeriksaan**

Hewan coba tikus diberi perlakuan berupa pengenalan pada metode pemeriksaan berupa latihan sebanyak dua kali sehari dengan tempat yang dipindah – pindah, sedangkan posisi landasan yang dituju tetap ( pada kuadran lima ) sesuai dengan pembagian kuadran. Terdapat lima rute yang harus ditempuh masing masing tikus, yaitu I : 1 – 5 ; II : 2 – 5 ; III : 8 – 5 ; IV : 3 – 5 dan V : 7 – 5

dengan waktu tempuh maksimal dalam proses mencari landasan yang dituju adalah selama 120 detik, serta diperkenankan berada diatas landasan selama maksimal lima belas detik.<sup>79</sup>

Tes pengenalan mula-mula dilakukan selama tiga hari, dan tiap usai melakukan tes maka tikus akan diletakkan dalam kandang transit yang diletakkan pada ruangan terbuka dibawah sinar matahari selama lima belas menit dan dikeringkan sebelum dimasukkan kembali kedalam kandang. Hal ini mempunyai tujuan agar menghindari terjadinya hipotermia. Sedang untuk kebersihan alat coba, air dalam bejana dibuang kemudian bejana dicuci dengan desinfektan serta dikeringkan untuk menghindari adanya organisme infeksius.<sup>79</sup>

#### **4.9.3. Prosedur Persiapan Dan Pemeriksaan Memori Spasial**

Selama tiga hari pertama percobaan, hewan coba tikus hanya akan diberi pakan standar BR-2 dan dibiarkan beradaptasi terhadap lingkungan kandang, dan pada hari ke empat mulailah seluruh hewan coba diberi pengenalan pada perangkat *Morris Water Maze* sebanyak dua kali sehari selama tiga hari sesuai metode pengenalan terhadap lingkungan pada awal percobaan, serta pada akhir sesi pengenalan alat sebelum dilakukannya perlakuan dihitunghlah rerata waktu tempuh oleh orang lain selain peneliti ( untuk menghilangkan bias penelitian ) dari masing masing kelompok pada hewan coba. Pada akhir perlakuan ( pada akhir minggu ke tiga ) dilakukan perhitungan kembali rerata waktu tempuh dengan alat *Morris Water Maze* pada ketiga kelompok hewan coba.<sup>79</sup>

#### 4.10 Protokol Penelitian

- Penelitian diawali dengan membagi tikus kedalam tiga kelompok dengan masing masing kelompok berisi lima ekor tikus dengan 1 cadangan ( untuk mengantisipasi terjadinya drop out ), yaitu Kelompok I ( P1 ) yang merupakan kelompok kontrol yaitu kelompok yang tidak diberi paparan monosodium glutamat, Kelompok II ( P2 ) yaitu kelompok yang diberi paparan monosodium glutamat per oral merek A yang dijual di pasaran dengan mencantumkan kadar monosodium glutamat sebesar 99% dengan dosis 5 mg / KgBB / hari sebanyak satu kali sehari dan Kelompok III ( P3 ) paparan monosodium glutamat per oral merek B yang dijual di pasaran tanpa mencantumkan kadar monosodium glutamat dengan dosis 5 mg / KgBB / hari sebanyak satu kali sehari
- Pada hari pertama hingga hari ketiga penelitian, ketiga kelompok tikus tersebut hanya akan diberi pakan standar BR-2 dan dibiarkan beradaptasi dengan lingkungan kandang.
- Pada hari keempat hingga ketujuh penelitian, ketiga kelompok tikus tersebut akan diberi pengenalan pada perangkat *Morris Water Maze* sebanyak dua kali sehari dan pada awal dan akhir ( sebelum dimulainya perlakuan ) pengenalan perangkat *Morris Water Maze* akan dihitung waktu tempuh tikus Wistar dengan waktu tempuh maksimal yang dibutuhkan oleh tikus adalah 120 detik serta diperkenankan berada diatas landasan selama maksimum 15 detik

menuju landasan yang dituju yaitu kuadran lima dengan rute sebagai berikut, I : 1 – 5 ; II : 2 – 5 ; III : 8 – 5 ; IV : 3 – 5 dan V : 7 – 5.

- Pada hari kedelapan hingga mencapai waktu tiga minggu, kelompok II dan kelompok III akan mendapat perlakuan yaitu pemberian monosodium glutamat dalam bumbu masak dengan menggunakan alat sonde lambung, sedangkan pada kelompok I tetap diberi pakan standar. Selama tiga minggu paparan, ketiga kelompok tikus tidak melakukan pengukuran waktu tempuh pada *Morris Water Maze*.
- Pada akhir perlakuan ( setelah tiga minggu perlakuan terpenuhi ) akan dilakukan kembali pengukuran waktu tempuh pada ketiga kelompok perlakuan.

#### 4.11 Analisis Data

Analisis data dilakukan sebagai berikut :

- Uji normalitas dengan *Saphiro – Wilk*, untuk mengetahui distribusi dan kenormalan data ( $p > 0,05$ ).
- Uji beda berpasangan dengan dua variabel digunakan *Paired T Test* saat data berdistribusi normal dan *Wilcoxon Signed Rank Test* saat data berdistribusi tidak normal.
- Uji beda berpasangan dua variabel dengan *Paired T Test* dan juga *Wilcoxon Signed Rank Test* untuk melihat pada masing-masing kelompok:
  - Perbedaan antara rerata waktu tempuh antara awal pengenalan alat dengan sebelum perlakuan,
  - Perbedaan antara rerata waktu tempuh antara pada saat sebelum perlakuan dengan tiga minggu setelah perlakuan.
- Uji beda berpasangan dua variable dengan *Paired T Test* dan juga *Wilcoxon Signed Rank Test* untuk melihat pada masing-masing kelompok:
  - Perbedaan antara selisih waktu tempuh antara awal pengenalan alat dan sebelum perlakuan dengan selisih waktu tempuh antara awal pengenalan alat dan tiga minggu setelah perlakuan,
  - Perbedaan antara selisih waktu tempuh antara awal pengenalan alat dan sebelum perlakuan dengan selisih waktu tempuh antara sebelum perlakuan dan tiga minggu setelah perlakuan

- Perbedaan antara selisih waktu tempuh antara awal pengenalan alat dan tiga minggu setelah perlakuan dengan selisih waktu tempuh antara sebelum perlakuan dan tiga minggu setelah perlakuan.
- Uji beda tidak berpasangan dua variabel menggunakan uji *Independent T Test* saat data berdistribusi normal dan uji *Mann Whitney* saat data berdistribusi tidak normal.
- Uji beda tidak berpasangan dua variabel menggunakan uji *Independent T Test* dan uji *Mann Whitney* untuk melihat pada kelompok yang berbeda:
  - Perbedaan antara rerata waktu tempuh awal pengenalan alat untuk kelompok kontrol-kelompok 1 ; kelompok kontrol-kelompok 2 ; kelompok 1-kelompok 2.
  - Perbedaan antara rerata waktu tempuh pada saat sebelum perlakuan untuk kelompok kontrol - kelompok 1 ; kelompok kontrol - kelompok 2 ; kelompok 1 - kelompok 2.
  - Perbedaan antara rerata waktu tempuh tiga minggu setelah perlakuan untuk kelompok kontrol - kelompok 1 ; kelompok kontrol - kelompok 2 ; kelompok 1 - kelompok 2.
- Uji beda tidak berpasangan dua variabel menggunakan uji *Independent T Test* dan uji *Mann Whitney* untuk melihat pada kelompok yang berbeda:
  - Perbedaan antara selisih waktu tempuh antara awal pengenalan alat dan sebelum perlakuan untuk kelompok kontrol - kelompok 1 ; kelompok kontrol - kelompok 2 ; kelompok 1 - kelompok 2

- Perbedaan antara selisih waktu tempuh antara awal pengenalan alat dan tiga minggu setelah perlakuan untuk kelompok kontrol - kelompok 1 ; kelompok kontrol - kelompok 2 ; kelompok 1 - kelompok 2
- Perbedaan antara selisih waktu tempuh antara sebelum perlakuan dan tiga minggu setelah perlakuan untuk kelompok kontrol - kelompok 1 ; kelompok kontrol - kelompok 2 ; kelompok 1 - kelompok 2
- Data diolah dengan SPSS for windows dan menunjukkan hasil signifikan jika (  $p < 0,05$  ).



#### 4.12 Etika Penelitian

Sebelum dilakukannya penelitian terhadap hewan coba tikus Wistar pada percobaan ini, maka terlebih dahulu dimintakan perihal *Ethical Clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan ( KPEK ) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP dr Kariadi, Semarang. Pada saat dilakukannya penelitian ini, akan memperhatikan prinsip – prinsip dalam deklarasi Helsinki dan juga Pedoman Nasional Etik Penelitian Kesehatan Departemen Kesehatan RI 2004

#### 4.13 Jadwal Penelitian

**Tabel 5.** Jadwal Penelitian

No	Bulan	Keterangan
1.	November hingga Februari	Proses pembuatan proposal
2.	Maret hingga April	Proses pengumpulan alat dan bahan
3.	26 April – 21 Mei	Proses percobaan hewan coba tikus Wistar menggunakan alat <i>Morris Water Maze</i> selama tiga minggu
4.	Mei - Juli	Proses pengumpulan data serta pembuatan laporan hasil
5.	18 Juli 2014	Pelaksanaan ujian hasil oleh tim KTI
6.	23 Juli 2014	Pengumpulan revisi laporan hasil