

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang lingkup penelitian

Ruang lingkup keilmuan dalam penelitian ini adalah ilmu farmakologi, histologi, dan patologi anatomi.

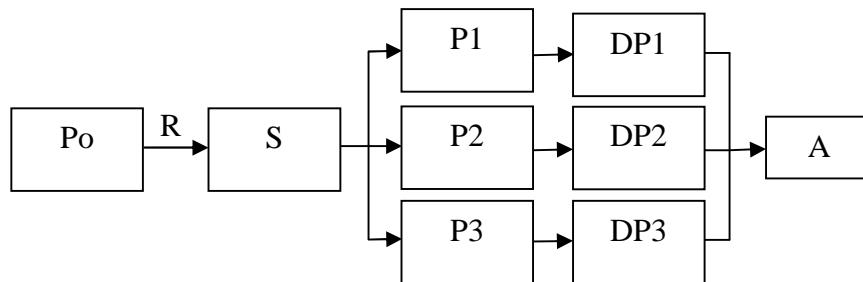
4.2 Tempat dan waktu penelitian

- 1) Tempat pemeliharaan dan intervensi terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.
- 2) Pembuatan preparat testis hewan coba dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Umum Pusat Dokter Kariadi.
- 3) Pengamatan struktur mikroskopis testis hewan coba dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- 4) Penelitian berlangsung selama bulan Maret-Mei 2015.

4.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni yang menggunakan hewan coba tikus dengan rancangan penelitian *The Post Test Only Control Group Design*. Perlakuan berupa pemberian dosis bertingkat madu pada tikus wistar yang diinduksi monosodium glutamat (MSG) dengan parameter

pengukuran variabel terikat yaitu gambaran mikroskopis testis. Rancangan dari penelitian ini dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Rancangan penelitian

Keterangan:

Po : Populasi tikus

S : Sampel

R : Randomisasi acak sederhana

P1 : Kelompok perlakuan 1, tikus diberi pakan standar dan MSG dengan dosis 6 mg/g BB/hari yang dilarutkan dalam 1 ml akuades selama 30 hari berturut turut.

P2 : Kelompok perlakuan 2, tikus diberi pakan standar dan MSG dengan dosis 6 mg/g BB/hari yang dilarutkan dalam 1 ml akuades, tikus diberi madu dengan dosis 2 g/200 g BB/hari 60 menit setelah pemberian MSG. Perlakuan 2 dilakukan selama 30 hari berturut-turut.

P3 : Kelompok perlakuan 3, tikus diberi pakan standar dan MSG dengan dosis 6 mg/g BB/hari yang dilarutkan dalam 1 ml akuades, tikus diberi madu dengan dosis 4 g/200 g BB/hari

60 menit setelah pemberian MSG. Perlakuan 3 dilakukan selama 30 hari berturut-turut.

DP1-DP3 : Data hasil pengamatan mikroskopis testis kelompok perlakuan P1,P2,P3

A : Analisis data

4.4 Populasi dan sampel

4.4.1 Populasi penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah tikus wistar jantan.

4.4.2 Sampel penelitian

Sampel penelitian diambil dari populasi yang memenuhi kriteria inklusi, eksklusi, dan *drop out*.

4.4.2.1 Kriteria inklusi

- 1) Umur 2-3 bulan.
- 2) Berat badan rata-rata $100-200 \pm 20$ gram.

4.4.2.2 Kriteria eksklusi

- 1) Terdapat kecacatan anatomis.

4.4.2.3 Kriteria *drop out*

- 1) Terdapat kecacatan anatomis selama penelitian.
- 2) Mati selama penelitian.

4.4.3 Cara *sampling*

Pengambilan sampel menggunakan teknik randomisasi acak sederhana, yang mana tiap unit dari populasi diberi nomor urut lalu dipilih sampel secara random berdasarkan nomor urut tersebut.

4.4.4 Besar sampel

Penentuan besar sampel minimal yang digunakan adalah menurut *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) dan *World Health Organization* (WHO), yaitu 5 ekor tiap kelompok dengan menganut prinsip 3R (*Replacement, Reduction, and Refinement*), dan untuk mengantisipasi dikeluarkannya tikus akibat adanya kriteria *drop out* maka pada tiap kelompok ditambahkan satu ekor tikus.^{47,48} Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 18 ekor tikus, yang mana tiap kelompok masing-masing berisi 6 ekor tikus.

4.5 Variabel penelitian

4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah monosodium glutamat (MSG) dan madu.

4.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran mikroskopis testis.

4.6 Definisi operasional

4.6.1 Variabel bebas

1) Monosodium glutamat (MSG)

Monosodium glutamat yang digunakan dalam penelitian ini adalah MSG murni dan tersedia di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 6 mg/g BB tikus/hari berdasarkan pertimbangan dari penelitian-penelitian sebelumnya dan dosis letal median (LD-50) dari MSG untuk tikus.^{8,15,49} Serbuk MSG dilarutkan dalam 1 ml akuades dan pemberian MSG dilakukan secara per oral dengan bantuan sonde selama 30 hari berturut-turut.

Skala adalah nominal.

2) Madu

Madu yang digunakan dalam penelitian ini adalah madu murni jenis madu embun (*black forest honey*) dengan merek Langnese (nomor registrasi BPOM: 152109006038) dengan tanggal kadaluarsa 14 Maret 2017. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah dosis konversi untuk tikus dari penggunaan optimal madu sebagai antioksidan untuk manusia. Penggunaan madu yang optimal sebagai antioksidan untuk manusia adalah 1.5 g/kg BB/hari.⁵⁰ Dosis dikonversikan dengan tabel konversi Laurence dan Bacharach sehingga ditemukan dosis yang sesuai

untuk tikus.⁵¹ Pemberian madu dilakukan secara per oral dengan bantuan sonde, diberikan 60 menit setelah pemberian MSG selama 30 hari berturut-turut.

Dosis madu yang digunakan adalah:

a. Dosis kelompok perlakuan 2:

Diketahui dosis madu untuk manusia adalah 1,5 g/kg BB/hari, maka untuk manusia dengan berat badan 70 kg diperlukan dosis sebesar 105 g.

Konversi untuk tikus:

$$0.018 \times 105 \text{ g} = 2 \text{ g}$$

Sehingga dosis madu yang diberikan untuk kelompok perlakuan 2 adalah 2 g/200 g BB tikus/hari.

b. Dosis kelompok perlakuan 3:

4 g/200 g BB tikus/hari.

Skala adalah nominal.

4.6.2 Variabel terikat

1) Gambaran mikroskopis testis

Gambaran mikroskopis testis dinilai dengan menggunakan kriteria Johnsen (perhitungan kuantitas dengan penilaian 1-10) berdasarkan *European Association of Urology*, yaitu:

Nilai 10: Kriteria spermatogenesis lengkap dan teratur dengan jumlah sel spermatozoa lebih dari atau sama dengan sepuluh, epitel tubulus seminiferus normal, dan lumen tubulus seminiferus terbuka.

Nilai 9: Jumlah sel spermatozoa lebih dari atau sama dengan sepuluh, epitel tubulus seminiferus tidak teratur dan tampak lepas, dan lumen tubulus seminiferus tertutup.

Nilai 8: Jumlah sel spermatozoa dalam tubulus seminiferus kurang dari sepuluh.

Nilai 7: Tidak tampak sel spermatozoa dalam tubulus seminiferus, tetapi jumlah sel spermatid dalam tubulus seminiferus lebih dari atau sama dengan sepuluh.

Nilai 6: Tidak terdapat sel spermatozoa dalam tubulus seminiferus dan jumlah sel spermatid dalam tubulus seminiferus kurang dari sepuluh.

Nilai 5: Tidak terdapat sel spermatozoa dan sel spermatid dalam tubulus seminiferus, tetapi jumlah sel spermatosit dalam tubulus seminiferus lebih dari atau sama dengan lima.

Nilai 4: Tidak terdapat sel spermatozoa dan sel spermatid dalam tubulus seminiferus dan jumlah spermatosit dalam tubulus seminiferus kurang dari lima.

Nilai 3: Sel spermatogenik dalam tubulus seminiferus hanya terdiri atas sel spermatogonium.

Nilai 2: Tidak terdapat sel spermatogenik dalam tubulus seminiferus, hanya sel sertoli.

Nilai 1: Tidak ada sel sama sekali dalam tubulus seminiferus.

Nilai yang ada selanjutnya dikategorikan menjadi 4 kategori; nilai 10,9,8 termasuk dalam kategori *obstructive cases/normal*; nilai 7,6 termasuk

dalam kategori *late maturity arrest*; nilai 5,4,3 termasuk dalam kategori *early maturity arrest*; dan nilai 2,1 termasuk dalam kategori *absence of germ cell*.^{52,53}

Skala adalah ordinal.

4.7 Cara pengumpulan data

4.7.1 Bahan

- 1) Tikus wistar jantan
- 2) Pakan standar hewan percobaan
- 3) Monosodium glutamat (MSG)
- 4) Madu
- 5) Akuades
- 6) Bahan untuk pembuatan preparat histologi
- 7) Bahan untuk pengecatan HE (Hematoksilin dan Eosin)

4.7.2 Alat

- 1) Timbangan duduk dan timbangan neraca
- 2) Kandang hewan coba
- 3) Gelas ukur dan pengaduk
- 4) Sonde
- 5) Alat bedah hewan percobaan: scapel, pinset, gunting, jarum, dan meja lilin
- 6) Alat untuk pembuatan preparat histologi
- 7) Alat untuk pengecatan HE (Hematoksilin dan Eosin)
- 8) Mikroskop cahaya medan terang

4.7.3 Jenis data

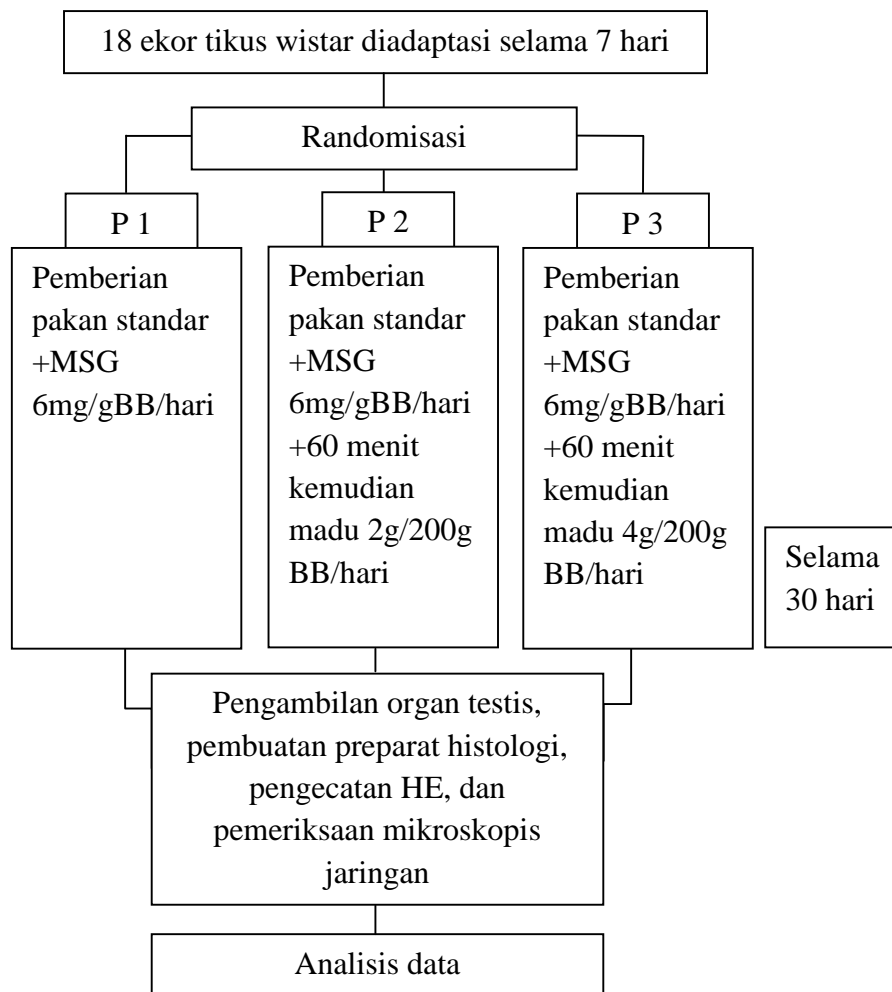
Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer, yaitu data yang didapat langsung dari pemeriksaan mikroskopis testis menggunakan mikroskop cahaya medan terang.

4.7.4 Cara kerja

- 1) Sampel (18 ekor tikus wistar) diadaptasi dan diberi pakan dan minum standar secara *ad libitum* selama 7 hari di laboratorium.
- 2) Sampel (18 ekor tikus wistar) dikelompokkan dengan teknik randomisasi acak sederhana menjadi 3 kelompok (masing-masing kelompok berjumlah 6 ekor tikus), yaitu kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3.
- 3) Monosodium glutamat dipersiapkan dengan dosis 6 mg/g BB tikus/hari, madu dipersiapkan dengan dosis 2 g/200 g BB/hari untuk kelompok perlakuan 2, dan madu dengan dosis 4 g/200 g BB/hari untuk kelompok perlakuan 3.
- 4) Kelompok perlakuan 1: tikus diberikan pakan dan minum standar secara *ad libitum* dan MSG dosis 6 mg/g BB/hari yang dilarutkan dalam 1 ml akuades diberikan secara per oral dengan bantuan sonde selama 30 hari berturut-turut.
- 5) Kelompok perlakuan 2: tikus diberikan pakan dan minum standar secara *ad libitum* dan MSG dosis 6 mg/g BB/hari yang dilarutkan dalam 1 ml akuades secara per oral dengan bantuan sonde, madu dosis

- 2 g/200 g BB/hari diberikan secara per oral dengan bantuan sonde 60 menit setelah pemberian MSG. Perlakuan 2 dilakukan selama 30 hari berturut-turut.
- 6) Kelompok perlakuan 3: tikus diberikan pakan dan minum standar secara *ad libitum* dan MSG dosis 6 mg/g BB/hari yang dilarutkan dalam 1 ml akuades secara per oral dengan bantuan sonde, madu dosis 4 g/200 g BB/hari diberikan secara per oral dengan bantuan sonde 60 menit setelah pemberian MSG. Perlakuan 3 dilakukan selama 30 hari berturut-turut.
- 7) Tikus dikorbankan pada hari ke-31 dengan cara dibius dengan eter alkohol hingga tidak sadar lalu diterminasi dengan dislokasi vertebra servikalis, lalu dibedah dan kemudian organ testis diambil untuk selanjutnya preperat histologi dibuat dengan metode blok parafin dengan pengecatan HE.
- 8) Struktur mikroskopis testis diamati dengan penggunaan mikroskop cahaya medan terang dengan pembesaran 400x dalam 5 lapangan pandang lalu digolongkan berdasarkan kriteria Johnsen. Pengamatan dilakukan oleh ahli dan peneliti secara *blinding* dalam rangka penghindaran subyektifitas.

4.8 Alur penelitian



Gambar 8. Alur penelitian

4.9 Analisis data

Data yang terkumpul diolah terlebih dahulu melalui proses *editing*, *coding*, *entrying*, dan *cleaning* data, lalu data dianalisis secara statistik dengan program *SPSS (Statistical Product and Service Solution) 21.0 for Windows*. Data yang didapat dari pengamatan oleh ahli akan dibandingkan dengan data yang diamati oleh peneliti dengan menggunakan uji *Kappa* (uji proporsi respon

