

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **1.1 Ruang Lingkup Penelitian**

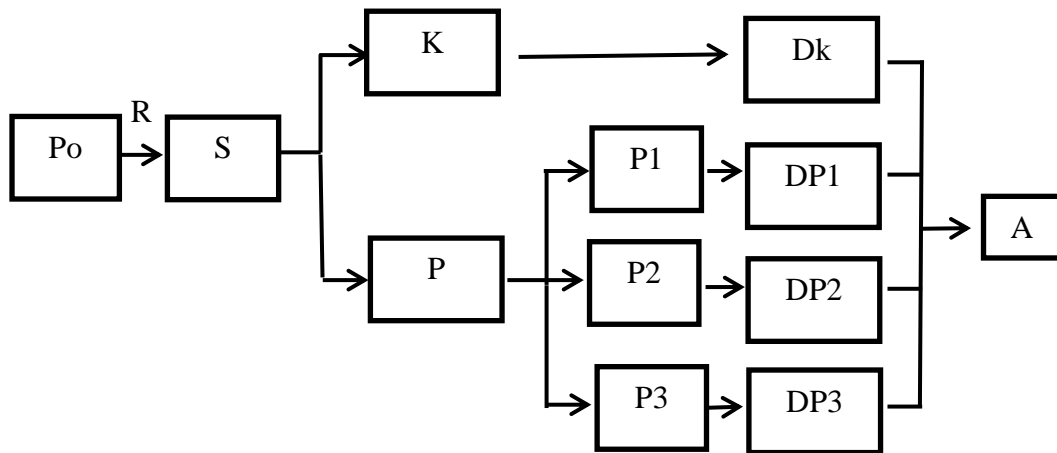
Pada penelitian ini, ruang lingkup keilmuan yang digunakan adalah Ilmu Histologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

#### **1.2 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 duodenum hewan coba dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP dr. Kariadi Semarang.
- 3) Penelitian dan pengumpulan data berlangsung dari bulan Maret s/d Mei 2015.

#### **1.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *true experimental* dengan *Post Test Only Control Group Design*, yang menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian. Perlakuan berupa pemberian dosis bertingkat madu pada tikus wistar yang diberi monosodium glutamat dengan parameter pengukuran variabel yaitu gambaran mikroskopis duodenum. Pada kelima kelompok tidak diawali dengan pra tes karena pada penelitian ini pengambilan organ untuk pemeriksaan hanya bisa dilakukan satu kali, sehingga tidak memungkinkan untuk dilakukan keduanya.



**Gambar 2.** Rancangan penelitian

Keterangan:

Po : Populasi tikus

R : Random sampling sederhana

S : Sampel

K :Kontrol, yaitu tikus wistar jantan yang diberi pakan standar dengan pemberian *aquades* per oral  $\pm 10$  ml/100grbb tikus secara *ad libitum* selama 30 hari berturut-turut.

P : Kelompok perlakuan

- P1 : Perlakuan 1, tikus wistar jantan yang diberi pakan standar dengan pemberian *aquades* per oral  $\pm 10$  ml/100grbb tikus secara *ad libitum* dan pemberian MSG per oral dengan dosis 6 mg/g BB dengan bantuan sonde. Serbuk MSG dilarutkan dalam 1 ml *aquades*. Perlakuan 1 dilakukan selama 30 hari berturut turut.

- P2 : Perlakuan 2, tikus wistar jantan yang diberi pakan standar dengan pemberian *aquades* per oral  $\pm 10$  ml/100grbb tikus secara *ad libitum* dan pemberian MSG per oral dengan dosis 6 mg/gr BB dengan bantuan sonde. Serbuk MSG dilarutkan dalam 1 ml *aquades*. Setelah 60 menit pemberian MSG, diberikan madu dengan dosis 2mg/200gr. Perlakuan 2 dilakukan selama 30 hari berturut turut.
- P3 : Perlakuan 3, tikus wistar jantan yang diberi pakan standar dengan pemberian *aquades* per oral  $\pm 10$  ml/100grbb tikus secara *ad libitum* dan pemberian MSG per oral dengan dosis 6 mg/gr BB dengan bantuan sonde. Serbuk MSG dilarutkan dalam 1 ml *aquades*. Setelah 60 menit pemberian MSG, diberikan madu dengan dosis 4 mg/200gr. Perlakuan 3 dilakukan selama 30 hari berturut turut.

DK : Data hasil pengamatan histologi duodenum kelompok kontrol.

DP1-DP3 : Data hasil pengamatan histologi duodenum tikus P1,P2,P3

A : Analisis Data

## **1.4 Populasi dan Sampel Penelitian**

### **1.4.1 Populasi Penelitian**

Populasi dari penelitian ini adalah tikus wistar jantan.

### **1.4.2 Sampel Penelitian**

Sampel penelitian diambil dari populasi secara acak dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

#### **1.4.2.1 Kriteria inklusi**

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

#### **1.4.2.2 Kriteria eksklusi**

Terdapat kecacatan anatomis.

#### **1.4.3 Cara Sampling**

Sampling pada penelitian ini dilakukan secara randomisasi atau acak.

#### **1.4.4 Besar sample**

Penentuan besar sampel minimal yang digunakan menurut *World Health Organization ( WHO )* adalah 5 ekor tiap kelompok. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 20 ekor tikus strain wistar jantan , tiap kelompok masing masing berisi 5 ekor. Sedangkan untuk mengantisipasi dikeluarkannya tikus akibat adanya kriteria *eksklusi* selama penelitian, maka pada tiap kelompok akan ditambahkan satu ekor tikus sehingga jumlah sampel yang digunakan adalah sebesar 24 ekor.

### **1.5 Variabel Penelitian**

#### **1.5.1 Variabel bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah madu dan MSG.

#### **1.5.2 Variabel Terikat**

Varibel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran mikroskopis duodenum tikus strain wistar jantan.

## 1.6 Definisi Operasional

1) Variabel bebas : madu dan MSG

- **Madu**

Penggunaan madu yang optimal sebagai antioksidan dalam mencegah dan memperbaiki stres oksidatif berdasarkan jurnal *Honey as Nutrient and Functional Food* (Stefan Bogdanov) untuk manusia adalah 1.5 gr/kgBB. Madu yang digunakan adalah *Langnese Black Forest Honey* dengan tanggal kadaluarsa 14 Maret 2017. Madu Black Forest/ Madu embun yang dipilih merupakan madu murni dengan nutrisi dan antioksidan yang tinggi. Dalam penelitian ini dosis dikonversikan dengan tabel konversi dosis *Pages* dan *Barnes* sehingga ditemukan dosis yang sesuai untuk tikus wistar jantan. Pemberian Madu diberikan peroral dengan sonde dalam dua dosis diberikan 60 menit setelah pemberian MSG per oral dengan dosis 6 mg/gr BB dengan bantuan sonde yang dilarutkan dalam 1 ml *aquades* :

a. Dosis perlakuan 2 :

Diketahui dosis untuk manusia adalah 1,5 g/kgBB, Maka untuk manusia dengan berat badan 70 kg diperlukan dosis sebesar 105 gr/70kg.

Konversi untuk tikus wistar :  $0.018 \times 105 \text{ gram} = 2 \text{ mg}$

Sehingga dosis madu yang diberikan untuk perlakuan I adalah 2mg madu/200 gram tikus wistar perhari .Madu akan diberikan selama 30 hari berturut-turut.

- b. Dosis perlakuan 3 : dosis dikalikan 2 dari dosis perlakuan 2 menjadi 4 mg madu/200 gram tikus wistar per hari. Madu akan diberikan selama 30 hari berturut-turut.

Skala adalah nominal.

- **Monosodium glutamat (MSG)**

Monosodium glutamat yang digunakan adalah murni mengandung 100% MSG dan tersedia di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Negeri Semarang. Serbuk MSG sejumlah 6mg/gr dilarutkan dalam 1 ml *Aquades*. Monosodium glutamat mempunyai toksisitas akut yang sangat rendah, yang pada keadaan normal mempunyai *Lethal Dose* secara oral pada 50% subjek penelitian berupa hewan coba tikus mencapai 15.000 – 18.000 mg/KgBB.

Skala adalah nominal.

2) Variabel terikat : Gambaran mikroskopis duodenum.

Gambaran mikroskopis duodenum adalah gambaran duodenum tikus wistar jantan yang diamati di bawah mikroskop yang telah mengalami perlakuan selama 30 hari berupa sel duodenum yang normal dan sel duodenum yang telah mengalami kerusakan berupa perubahan struktur epitel mukosa. Adapun cara pembuatan preparat menggunakan metode baku histologi pemeriksaan jaringan. Dari setiap tikus dibuat dua

sampai tiga preparat jaringan duodenum dan tiap preparat dibaca dalam 5 lapangan pandang dengan pembesaran 100x dan 400x. Penilaian terhadap gambaran mikroskopis duodenum tersebut dilihat berdasarkan modifikasi Barthel Manja pada

Tabel 3. Skor Integritas Epitel Mukosa Duodenum

No.	Skor	Integritas Epitel Mukosa Duodenum
1.	0	Tidak ada perubahan patologis
2.	1	Deskuamasi epitel
3.	2	Erosi permukaan epitel (gap 1-10 sel epitel/ lesi)
4.	3	Ulserasi epitel (gap > 10 sel epitel/ lesi)

## 1.7 Cara Pengumpulan Data

### 1.7.1 Alat

- 1) Kandang hewan coba
- 2) Timbangan duduk dan timbangan neraca
- 3) Sonde lambung
- 4) Alat bedah hewan percobaan : scapel, pinset, gunting, jarum, dan meja lilin
- 5) Alat untuk pembuatan preparat histologi (mikrotom, oven, cetakan parafin)

- 6) Alat untuk melihat histologik duodenum: deck glass, object glass, mikroskop cahaya.
- 7) Gelas ukur dan pengaduk
- 8) Pemanas dan alat pemotong

### **1.7.2 Bahan**

- 1) Makanan dan minuman standard hewan percobaan
- 2) Tikus strain wistar jantan
- 3) Bahan pengecatan preparat histologi dengan pengecatan HE
  - a. Larutan buffer formalin 10%
  - b. Parafin
  - c. Albumin
  - d. Larutan xylol
  - e. Alkohol bertingkat : 30%, 40%, 50%, %, 70%, 80%, 90%, 96%.
  - f. Aquadest
  - g. Eter
- 4) Madu
- 5) MSG

### **1.7.3 Jenis data**

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini merupakan data primer. Data diperoleh langsung dari subjek penelitian. Data primer yang dikumpulkan adalah



data yang bersumber dari pemeriksaan mikroskopis terhadap organ duodenum tikus wistar.

#### 1.7.4 Cara Kerja

Cara kerja dalam penelitian meliputi langkah-langkah sebagai berikut :

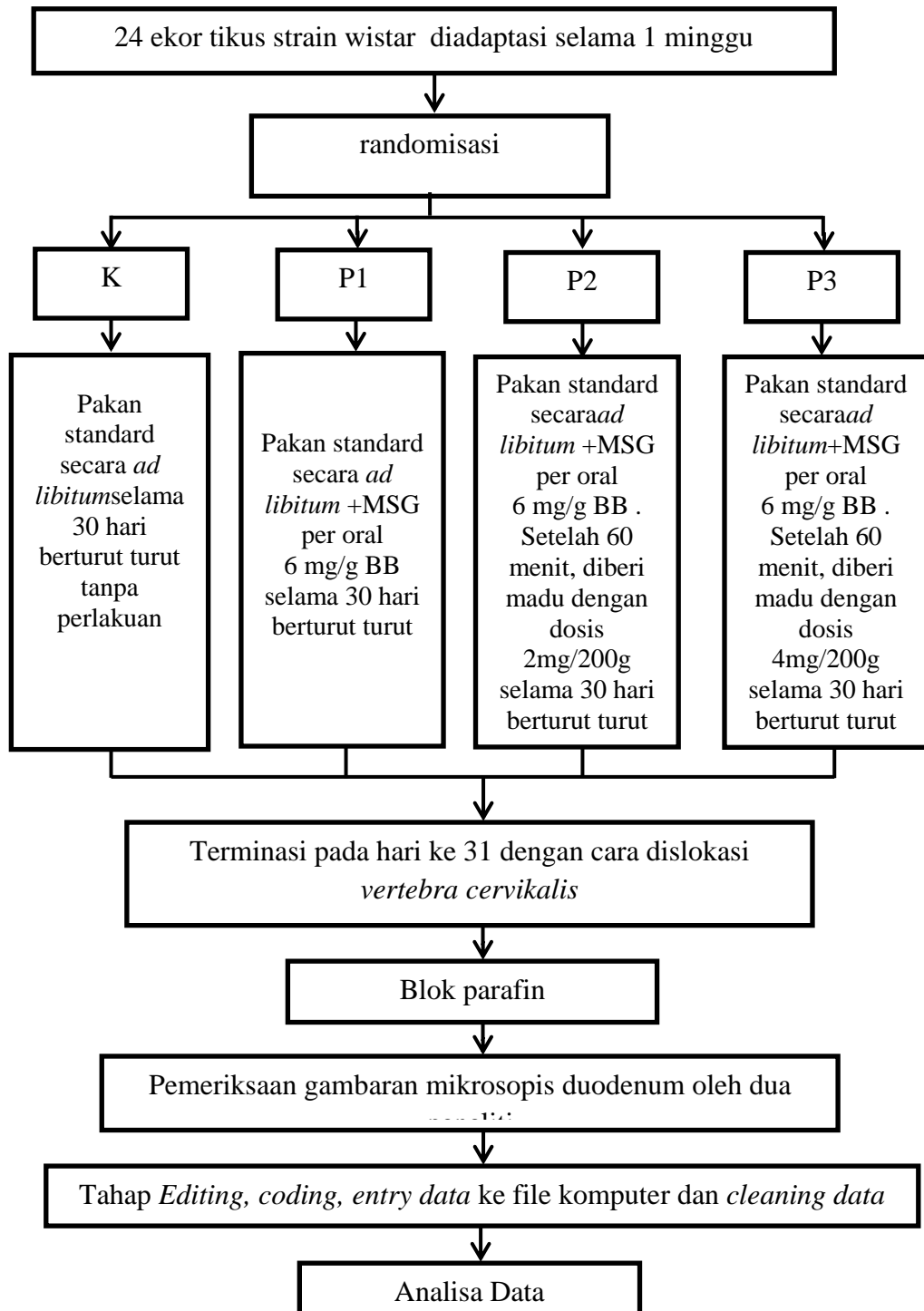
- 1) Sampel diadaptasikan selama satu minggu di laboratorium dan diberi pakan standard.
- 2) Sampel dipilih berdasarkan *simple random sampling* ,24 ekor tikus strain wistar jantan dibagi dalam 4 kelompok.
- 3) Persiapan monosodium glutamat murni dengan dosis 6mg/gr. Dosis ditentukan berdasarkan penelitian sebelumnya.
- 4) Persiapan madu dengan dosis yang telah dikonversikan adalah 2 mg/200gr madu untuk perlakuan 2 dan 4 mg/200gr untuk perlakuan 3.
- 5) Kelompok kontrol diberi pakan standard dengan pemberian *aquades* per oral  $\pm 10$  ml/100grbb tikus secara *ad libitum* selama 30 hari berturut turut tanpa perlakuan. Setelah itu, organ duodenum tikus strain wistar diambil untuk dilakukan pemeriksaan mikroskopis jaringan.
- 6) Kelompok perlakuan 1,tikus wistar jantan diberi pakan standard dengan pemberian *aquades* per oral  $\pm 10$  ml/100grbb tikus secara *ad libitum* dan pemberian MSG per oral dengan dosis 6 mg/g BB dengan bantuan sonde. Serbuk MSG dilarutkan dalam 1 ml *aquades*. Pemberian dosis monosodium glutamat adalah berdasarkan jurnal penelitian sebelumnya yang melakukan penelitian dengan dosis sebesar 6mg/gr. Perlakuan 1 dilakukan selama 30 hari berturut turut.

Setelah itu, organ duodenum tikus wistar diambil untuk dilakukan pemeriksaan mikroskopis jaringan.

- 7) Kelompok perlakuan 2, tikus wistar jantan diberi pakan standard dengan pemberian *aquades* per oral  $\pm 10$  ml/100grbb tikus secara *ad libitum* dan pemberian MSG per oral dengan dosis 6 mg/g BB dengan bantuan sonde. Serbuk MSG dilarutkan dalam 1 ml *aquades*. Setelah 60 menit pemberian MSG, diberikan madu dengan dosis 2 mg/200g. Perlakuan 2 dilakukan selama 30 hari berturut turut. Setelah itu, organ duodenum tikus strain wistar diambil untuk dilakukan pemeriksaan mikroskopis jaringan.
- 8) Perlakuan 3, tikus wistar jantan diberi pakan standard dengan pemberian *aquades* per oral  $\pm 10$  ml/100grbb tikus secara *ad libitum* dan pemberian MSG per oral dengan dosis 6 mg/g BB dengan bantuan sonde. Serbuk MSG dilarutkan dalam 1 ml *aquades*. Setelah 60 menit pemberian MSG, diberikan madu dengan dosis 4 mg/200g. Perlakuan 3 dilakukan selama 30 hari berturut turut. Setelah itu, organ duodenum tikus strain wistar diambil untuk dilakukan pemeriksaan mikroskopis jaringan.
- 9) Pada hari ke 31 setelah perlakuan selesai diberikan, semua hewan percobaan dikorbankan dengan cara *dislokasi vertebra cervikalis*, kemudian organ *duodenum* diambil untuk selanjutnya dibuat preparat histologi dengan metode blok paraffin dengan pengecatan HE. Hal ini dilakukan pada hari ke-31 agar efek perlakuan tampak nyata.

- 10) Pemeriksaan histologi jaringan duodenum meliputi *processing* dengan pengambilan jaringan dan fiksasi, pemotongan blok, dan pengecatan He. Dari setiap tikus dibuat dua sampai tiga preparat jaringan duodenum dan tiap preparat dibaca dalam 5 lapangan pandang dengan pembesaran 100x dan 400x. Pengamatan dilakukan oleh peneliti dan ahli *secara blind* dalam rangka penghindaran subjektifitas
- 11) Kriteria penilaian gambaran histologis duodenum yang digunakan adalah sistem *skoring Histopathology Bhartel Manja* yang dapat dilihat pada Tabel 3

### 1.8 Alur Penelitian



**Gambar xx.** Alur penelitian

## 1.9 Analisis Data

Uji hipotesis yang digunakan adalah uji komparatif *Chi-Square* karena kelompok-kelompok pengukuran dalam penelitian ini tidak berpasangan dan berjumlah lebih dari 2 kelompok, serta variabel- variabel dalam penelitian ini berskala kategorikal (nominal/ordinal). Jika syarat uji *Chi-Square* tidak terpenuhi, maka akan digunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Nilai p dianggap bermakna apabila  $p < 0,05$  dengan 95% interval kepercayaan.

## 1.10 Etika Penelitian

Sebelum dilakukannya penelitian terhadap hewan coba tikus Wistar pada percobaan ini, maka terlebih dahulu akan dimintakan perihal *Ethical Clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan ( KPEK ) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP dr Kariadi, Semarang.

