

III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan Rancangan Acak Terkontrol (RAT). Penelitian ini menggunakan lima kelompok perlakuan terhadap hewan percobaan mencit putih jantan (*Mus musculus L*) strain DD Webster dewasa.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selama 2 bulan.

C. Variable Penelitian

1. Variabel Bebas
 - a. MSG
 - b. Vitamin C

2. Variabel Terikat
 - a. Gambaran histopatologis hepar

D. Definisi Operasional

1. Monosodium Glutamat adalah penambah rasa makanan dengan *L-Glutamic Acid* sebagai komponen asam amino. Adapun MSG yang digunakan dalam penelitian ini adalah Monosodium Glutamat murni dan digunakan sebanyak 4 mg/ kgBB.
2. Vitamin C yang diberikan pada perlakuan dalam bentuk vitamin C sintetik berupa cairan yang diberikan per oral dengan beberapa macam dosis yang berbeda pada setiap kelompok perlakuan. Dosis efektif vitamin C pada mencit adalah 0,2 mg/grBB. Dosis vitamin C 0,2 mg/grBB diberikan pada kelompok kontrol positif; 0,07 mg/grBB diberikan pada kelompok perlakuan 1; 0,2 mg/grBB diberikan pada kelompok perlakuan 2 dan 0,6 mg/grBB diberikan pada kelompok perlakuan 3. Peningkatan dosis berdasarkan buku paduan penelitian ASEAN (ASEAN, 2007).
3. Histologis hepar
Gambaran Histologis hepar berupa kerusakan hepar tikus. Skala yang digunakan adalah skala numerik. Sediaan hepar diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Kerusakan yang diamati berupa degenerasi lemak yang terjadi pada hepatosit. Skala degenerasi lemak kemudian dihitung secara kuantitatif dalam 5 lapang pandang berbeda (Kawasaki *et al.*, 2009) dengan mikroskop cahaya perbesaran 1000x. Kriteria penilaian degenerasi lemak adalah (Kawasaki *et al.*, 2009):
0 = tidak ada hepatosit yang mengalami degenerasi lemak
1 = <10% hepatosit yang mengalami degenerasi lemak
2 = 10% – 33% hepatosit yang mengalami degenerasi lemak

3 = 34% – 66% hepatosit yang mengalami degenerasi lemak

4 = >66% – 100% hepatosit yang mengalami degenerasi lemak

E. Alat dan Bahan

1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan yaitu : kandang mencit yang terbuat dari kawat sebanyak 5 kandang, sonde lambung, spuit 1ml, botol yang tutupnya diberi pipa aluminium sebagai tempat minum mencit, seperangkat alat bedah, mikroskop, pipet tetes, erlenmeyer, mikrotom, rotary evaporator, soxhlet, pipet eppendorf, objek glass, aluminium foil, neraca analitik dan cover glass.

2. Bahan Penelitian

- a. Bahan Biologis: mencit jantan (*Mus musculus, L*) strain DD webster dewasa. umur 2,5-3 bulan dengan berat 25-35 gram dan sehat.
- b. Bahan kimia: Vitamin C sintetik, Monosodium glutamat murni, NaCl 0,9%, pelet ayam sebagai pakan mencit, , alkohol 70-100%, paraffin, xylol, canada balsam, dan zat warna HE (Haematoksilin-Eosin) dan aquadest.

F. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus, L*) strain DD webster dewasa. umur 2,5-3 bulan dengan berat 25-35 gram dan sehat yang ditandai dengan gerakan aktif, diperoleh dari IPB (Institut Pertanian Bogor).

Besar sampel ditentukan berdasarkan buku panduan penelitian WHO yaitu minimal 5 ekor mencit

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

tiap kelompok. Sedangkan, banyaknya pengulangan ditentukan berdasarkan rumus Ferderrer:

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,83$$

$$n \geq 5$$

t = kelompok perlakuan (5 kelompok)

n = jumlah pengulangan atau sampel tiap kelompok

G. Kriteria Inklusi dan Ekslusi

1. Kriteria Inklusi :

- a. Sehat
- b. Memiliki berat badan antara 25-35 gr
- c. Jenis kelamin jantan
- d. Usia 2,5-3 bulan

2. Kriteria Eksklusi:

- a. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah 1 minggu masa adaptasi di laboratorium.

H. Prosedur Penelitian

1. Pemeliharaan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan (*Mus musculus, L*) strain DD webster dewasa. umur 2,5-3 bulan dengan berat 25-35 gram dan sehat. Dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 0,5-1 cm dan diganti setiap tiga hari untuk mencegah infeksi yang dapat terjadi akibat kotoran mencit tersebut. Dalam 1 kelompok, 5 ekor mencit ditempatkan dalam 1 kandang. Cahaya ruangan dikontrol persis 12 jam terang (pukul 06.00 sampai dengan pukul 18.01) dan 12 jam gelap (pukul 18.00 sampai dengan pukul 06.01), sedangkan suhu dan kelembaban ruangan dibiarkan berada dalam kisaran alamiah.

Kandang ditempatkan dalam suhu kamar dan cahaya menggunakan sinar matahari tidak langsung. Makanan dan minuman diberikan secukupnya dalam wadah terpisah dan diganti setiap hari. Makanan yang diberikan pada mencit berupa pelet ayam, sedangkan air minum yang diberikan berupa air putih yang diletakkan dalam botol plastik yang disumbat pipa aluminium. Setiap mencit diberi perlakuan sekali sehari selama 15 hari.

2. Persiapan Hewan Uji

Sebelum diberi perlakuan, mencit diadaptasikan selama satu minggu di Ruang penelitian Fakultas Kedokteran Unila tempat dilaksanakannya penelitian. Terhadap setiap mencit ditimbang berat badannya dan diamati kesehatannya secara fisik (gerakannya, makan dan minumannya), sebelum diberi perlakuan.

3. Penyediaan Vitamin C dan Monosodium Glutamat

Vitamin C didapatkan dari Vitamin C sintetik yang terdapat dipasaran. Sedangkan untuk *Monosodium Glutammate* didapatkan dari Bagian Kimia FMIPA UNILA dalam bentuk *Monosodium Glutammate* murni yang dilarutkan dalam larutan NaCl 0,9% sebanyak 0,5 ml.

Pada penelitian ini zat padat yang digunakan berupa Monosodium Glutamat dengan kadar toksik 4 mg/gr berat badan (Nayanatara *et al.*, 2008). Sedangkan larutan yang digunakan sebagai pelarut ialah NaCl (larutan garam) 0.9% sebanyak 0,5 ml.

a. Pelarutan Monosodium Glutamat

Tahap selanjutnya adalah melarutkan MSG, terlebih dahulu diukur berat MSG yang akan digunakan. Berdasarkan referensi dosis MSG yang digunakan ialah 4 mg/gr BB hewan percobaan (Nayanatara *et al.*, 2008).

Dikarenakan berat badan hewan percobaan sebesar 30 gr, maka MSG yang digunakan sebesar:

$$\begin{aligned}\text{MSG} &= \text{dosis} \times \text{berat badan mencit} \\ &= 4 \text{ mg/gr BB} \times 30 \text{ gr} \\ &= 120 \text{ mg}\end{aligned}$$

Didapati berat MSG yang digunakan sejumlah 120 mg. Tahap selanjutnya ialah menimbang MSG dengan menggunakan neraca analitik sampai berat MSG 120 mg. Setelah ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur lalu ditambahkan dengan 0,5 ml larutan NaCl 0,9%. Setelah itu diaduk dengan spatula sampai kristal MSG larut.

b. Pengenceran Vitamin C

Pada penelitian ini vitamin C yang akan diinduksi harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu dengan menggunakan suatu larutan . Dalam hal ini, zat yang digunakan sebagai pelarut adalah aquades. Berdasarkan Pedoman penelitian ASEAN, dosis yang akan diberikan pada masing-masing hewan percobaan ialah:

- Kontrol : 0,2 mg/gr BB
- Perlakuan 1 : 0,07 mg/gr BB
- Perlakuan 2 : 0,2 mg/gr BB
- Perlakuan 3 : 0,6 mg/gr BB

Dikarenakan sediaan yang digunakan dalam penelitian ini berupa vitamin C dalam bentuk cairan, maka sebelum diencerkan terlebih dahulu dikonversikan ke dalam satuan mililiter (ml). Adapun perhitungannya ialah sebagai berikut:

Diketahui:

- Berat badan mencit : 30 gram
- Dosis Vitamin C:
 - Kontrol : 0,2 mg/gr BB
 - Perlakuan 1 : 0,07 mg/gr BB
 - Perlakuan 2 : 0,2 mg/gr BB
 - Perlakuan 3 : 0,6 mg/gr BB
- Tiap 2 ml vitamin C yang ada dalam 1 ampul mengandung 200 mg vitamin C

Perhitungan volume ,vitamin C yang akan diencerkan ialah:

- **Dosis Vitamin C untuk kontrol :**

$$\begin{aligned}
 K &= \text{dosis} \times \text{berat badan} \\
 &= 0,2 \text{ mg/gr BB} \times 30 \text{ gr} \\
 &= 6 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

Didapatkan dosis vitamin C dalam bentuk sediaan padat (gram) sebesar 6 gram, kemudian dikonversikan kedalam satuan mililiter dengan cara:

$$\begin{aligned}
 2 \text{ ml Vitamin C} &= 200 \text{ mg Vitamin C} \\
 X \text{ (Dosis vitamin C yang dicari)} &= 6 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

Maka hasil yang didapat ialah:

$$\begin{aligned}
 X &= (2 \text{ ml} \times 6 \text{ mg}) / 200 \text{ mg} \\
 X &= 0,06 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Jadi dosis vitamin C untuk kontrol ialah 0,06 ml.

- **Dosis Vitamin C untuk Perlakuan 1 :**

$$\begin{aligned} K &= \text{dosis} \times \text{berat badan} \\ &= 0,07 \text{ mg/gr BB} \times 30 \text{ gr} \\ &= 2,1 \text{ mg} \end{aligned}$$

Didapatkan dosis vitamin C dalam bentuk sediaan padat (gram) sebesar 2,1 gram, kemudian dikonversikan kedalam satuan mililiter dengan cara:

$$\begin{aligned} 2 \text{ ml Vitamin C} &= 200 \text{ mg Vitamin C} \\ X \text{ (Dosis vitamin C yang dicari)} &= 2,1 \text{ mg} \end{aligned}$$

Maka hasil yang didapat ialah:

$$\begin{aligned} X &= (2 \text{ ml} \times 2,1 \text{ mg}) / 200 \text{ mg} \\ X &= 0,021 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi dosis vitamin C untuk perlakuan 1 ialah 0,021 ml.

- **Dosis Vitamin C untuk Perlakuan 2 :**

$$\begin{aligned} K &= \text{dosis} \times \text{berat badan} \\ &= 0,2 \text{ mg/gr BB} \times 30 \text{ gr} \\ &= 6 \text{ mg} \end{aligned}$$

Didapatkan dosis vitamin C dalam bentuk sediaan padat (gram) sebesar 6 gram, kemudian dikonversikan kedalam satuan mililiter dengan cara:

$$\begin{aligned} 2 \text{ ml Vitamin C} &= 200 \text{ mg Vitamin C} \\ X \text{ (Dosis vitamin C yang dicari)} &= 6 \text{ mg} \end{aligned}$$

Maka hasil yang didapat ialah:

$$X = (2 \text{ ml} \times 6 \text{ mg}) / 200 \text{ mg}$$

$$X = 0,06 \text{ ml}$$

Jadi dosis vitamin C untuk perlakuan 2 ialah 0,06 ml.

- **Dosis Vitamin C untuk perlakuan 3 :**

$$K = \text{dosis} \times \text{berat badan}$$

$$= 0,6 \text{ mg/gr BB} \times 30 \text{ gr}$$

$$= 18 \text{ mg}$$

Didapatkan dosis vitamin C dalam bentuk sediaan padat (gram) sebesar 18 gram, kemudian dikonversikan kedalam satuan mililiter dengan cara:

$$2 \text{ ml Vitamin C} = 200 \text{ mg Vitamin C}$$

$$X (\text{Dosis vitamin C yang dicari}) = 18 \text{ mg}$$

Maka hasil yang didapat ialah:

$$X = (2 \text{ ml} \times 18 \text{ mg}) / 200 \text{ mg}$$

$$X = 0,18 \text{ ml}$$

Jadi dosis vitamin C untuk perlakuan 3 ialah 0,18 ml.

Setelah dilakukan perhitungan, cairan vitamin C tersebut kemudian diambil dengan menggunakan pipet mikron sesuai dosisnya masing-masing, dan dimasukkan ke dalam labu ukur satu per satu. Selanjutnya ditambahkan 0,5 ml aquades yang merupakan zat pelarut ke dalam labu ukur, lalu dihomogenkan/dilarutkan.

4. Pemberian Perlakuan

Setiap kelompok mempunyai perlakuan yang berbeda, yaitu:

1. Kontrol (-) : hanya diberi MSG 4 mg/gr berat badan yang dilarutkan dalam 0,5 ml NaCl 0,9% secara intraperitoneal.
2. Kontrol (+) : diberi vitamin C 0,2 mg/gr berat badan yang dilarutkan dalam 0,5 ml aquadest secara oral setiap hari selama 15 hari.
3. P1 : diberi MSG 4 mg/gr berat badan yang dilarutkan dalam 0,5 ml NaCl 0,9% secara intraperitoneal setiap hari selama 15 hari + diberi vitamin C 0,07 mg/gr berat badan yang dilarutkan dalam 0,5 ml aquadest secara oral setiap hari selama 15 hari.
4. P2: diberi MSG 4 mg/gr berat badan yang dilarutkan dalam 0,5 ml NaCl 0,9% secara intraperitoneal setiap hari selama 15 hari + diberi vitamin C 0,2 mg/gr berat badan yang dilarutkan dalam 0,5 ml aquadest secara oral setiap hari selama 15 hari
5. P3 : diberi MSG 4 mg/gr berat badan yang dilarutkan dalam 0,5 ml NaCl 0,9% secara intraperitoneal setiap hari selama 15 hari + diberi vitamin C 0,6 mg/gr berat badan yang dilarutkan dalam 0,5 ml aquadest secara oral setiap hari selama 15 hari

Perlakuan dilakukan selama 15 hari. Dosis toksik dari MSG didapatkan dari penelitian sebelumnya yang dilakukan pada tikus Wistar jantan dewasa yang disuntikan MSG dengan dosis 4 mg/kg berat badan selama 15 hari (kelompok jangka pendek) dan 30 hari (kelompok jangka panjang) (Nayantara *et al*, 2008). Dosis Vitamin C didapatkan dari dosis maksimal penelitian

sebelumnya yang belum berhasil yaitu 0,2 mg/gr berat badan kemudian dikalikan 1/3x untuk P1 yaitu 0,07 mg/gr berat badan , 1x untuk P2 yaitu 0,2 mg/gr berat badan dan 3x untuk P3 yaitu 0,6 mg/kg berat badan.

6. Pengamatan

Setelah 15 hari perlakuan, masing-masing hewan coba dikorbankan dengan cara dislokasi leher dan selanjutnya dibedah. Selanjutnya dilakukan pengamatan sebagai berikut :

- a. Pembuatan preparat hepar
- b. Pembuatan sediaan mikroskopis dilakukan dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksin-Eosin. Hematoksin memiliki sifat pewarna basa, yaitu memulas unsur jaringan yang basofilik, sedangkan eosin memulas unsur jaringan yang bersifat asidofilik. Kombinasi ini yang paling banyak digunakan (Junqueira dan Carneiro, 2007).
- c. Sampel hepar ini lalu difiksasi dengan formalin 10%. Selanjutnya, sampel ini dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi FK Unila untuk pembuatan sediaan mikroskopis jaringan hepar.

Metode teknik pembuatan preparat histopatologi menurut bagian PA FK Unila (2011):

1) *Fixation*

- a. Spesimen berupa potongan organ hepar yang telah dipotong secara representatif kemudian segera difiksasi dengan formalin 10% selama 3 jam.
- b. Dicuci dengan air mengalir sebanyak 3-5 kali.

2) *Trimming*

- a. Organ dikecilkan hingga ukuran ± 3 mm.
- b. Potongan organ hepar tersebut lalu dimasukkan ke dalam *tissue cassette*.

3) Dehidrasi

- a. Mengeringkan air dengan meletakkan *tissue cassette* pada kertas tisu.
- b. Berturut-turut organ hepar direndam dalam alkohol 70% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam, alkohol absolut selama 1 jam, dan alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam.

4) *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan xylol I dan II, masing-masing selama 1 jam.

5) Impregnasi

Impregnasi dilakukan dengan menggunakan paraffin selama 1 jam dalam oven suhu 65° C.

6) *Embedding*

- a) Sisa paraffin yang ada pada pan dibersihkan dengan memanaskan beberapa saat di atas api dan diusap dengan kapas.
- b) Paraffin cair disiapkan dengan memasukkan paraffin ke dalam cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu di atas 58° C.
- c) Paraffin cair dituangkan ke dalam pan.

- d) Dipindahkan satu per satu dari *tissue cassette* ke dasar pan dengan mengatur jarak yang satu dengan yang lainnya.
 - e) Pan dimasukkan ke dalam air.
 - f) Paraffin yang berisi potongan hepar dilepaskan dari pan dengan dimasukkan ke dalam suhu 4-6⁰ C beberapa saat.
 - g) Paraffin dipotong sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan skalpel/pisau hangat.
 - h) Lalu diletakkan pada balok kayu, diratakan pinggirnya, dan dibuat ujungnya sedikit meruncing.
 - i) Memblok paraffin, siap dipotong dengan mikrotom.
- 7) *Cutting*
- a) Pemotongan dilakukan pada ruangan dingin.
 - b) Sebelum memotong, blok didinginkan terlebih dahulu di lemari es.
 - c) Dilakukan pemotongan kasar, lalu dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron. Pemotongan dilakukan menggunakan *rotary microtome* dengan *disposable knife*.
 - d) Dipilih lembaran potongan yang paling baik, diapungkan pada air, dan dihilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
 - e) Lembaran jaringan dipindahkan ke dalam *water bath* suhu 60⁰ C selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.

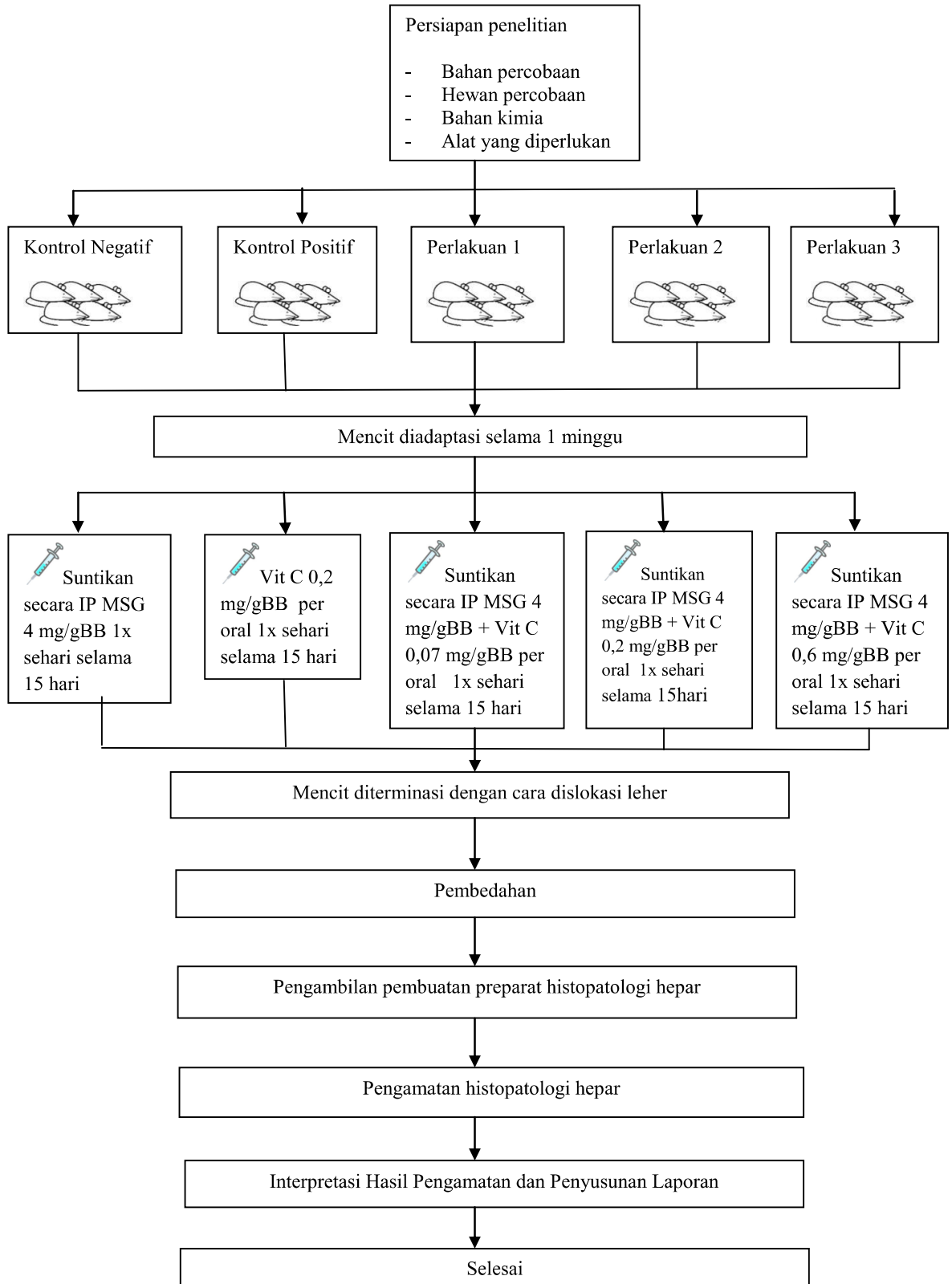
- f) Dengan gerakan menyendok, lembaran jaringan tersebut diambil dengan *slide* bersih dan ditempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah.
- g) *Slide* yang berisi jaringan ditempatkan pada inkubator (suhu 37⁰C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.
- 8) *Staining* (pewarnaan) dengan Harris Hematoksilin-Eosin
- Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, dipilih *slide* yang terbaik, selanjutnya dilakukan deparafinisasi dalam larutan xylol I selama 5 menit dan larutan xylol II selama 5 menit. Kemudian, dihidrasi dalam ethanol absolut selama 1 jam, alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 70% selama 2 menit, dan air selama 10 menit. Lalu dilakukan pulasan inti dengan Harris Hematoksilin selama 15 menit, dibilas dengan air mengalir, lalu diwarnai dengan eosin selama maksimal 1 menit. Selanjutnya, didehidrasi dengan alkohol 70% selama 2 menit, alkohol 96% selama 2 menit, dan alkohol absolut selama 2 menit. Kemudian dilakukan penjernihan dengan xylol I selama 2 menit dan xylol II selama 2 menit.
- 9) *Mounting* dengan entelan dan tutup dengan *deck glass*
- Setelah pewarnaan selesai, *slide* ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan *mounting*, yaitu entelan, dan ditutup dengan *deck glass*, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.
- 10) *Slide* dibaca dengan mikroskop
- Slide* diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x.

a. Pengamatan histologi hepar

Gambaran Histologi Hepar berupa kerusakan hepar mencit. Skala yang digunakan adalah skala numerik. Sediaan hepar diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Kerusakan yang diamati berupa degenerasi lemak yang terjadi pada hepatosit. Kerusakan dihitung secara kuantitatif dalam 5 lapang pandang berbeda (Kawasaki *et al.*, 2009) dengan mikroskop cahaya perbesaran 1000x. Kerusakan dihitung dan dijumlahkan tiap 5 lapangan pandang, kemudian dirata-rata dan dipersentasekan.

b. Analisa Data dan Pengujian Hipotesis

Kelompok penelitian terdiri dari 5 kelompok, yaitu: 3 kelompok perlakuan dan 2 kontrol dalam 5 kali pengulangan. Pada tiap kelompok, data yang terkumpul dianalisis menggunakan program SPSS 16.00 untuk Windows dengan menggunakan uji *one way anova* untuk menguji perbedaan rata-rata pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.



Gambar 13. Bagan Alur penelitian