

**Pengaruh Kombinasi MSG dan Diet Tinggi Lemak terhadap Siklus Estrus
pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* Strain Wistar) Betina**

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan



Oleh:

Nurul Putri Andani

145070607111003

PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH KOMBINASI MSG DAN DIET TINGGI LEMAK TERHADAP
SIKLUS ESTRUS PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus* Strain Wistar)
BETINA

Oleh:
Nurul Putri Andani
NIM 145070607111003

Telah diuji pada
Hari : Kamis
Tanggal: 1 Maret 2018
Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I


dr. Yhusi Karina Riskawati, M.Sc
NIK 20140580051212001

Pembimbing-I / Penguji-II


dr. Dewi Mustika, M. Biomed
NIK. 2016078711152001

Pembimbing-II / Penguji-III


dr. Maya Devi Arifandi, SpOG
NIK. 2016097902032001

Mengetahui,
Ketua Program Studi S1 Kebidanan



Linda Ratna Wati, SST, M.Kes
NIK. 198409132014042001



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nurul Putri Andani

NIM : 145070607111003

Program Studi : Program Studi S1 Kebidanan

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 20 Februari 2018

Yang membuat pernyataan,



(Nurul Putri Andani)

NIM. 145070607111003



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala kekuatan dan kemudahan yang telah diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian serta penyusunan Tugas Akhir yang berjudul "*Pengaruh Kombinasi MSG dan Diet Tinggi Lemak terhadap Siklus Estrus pada Tikus Putih (Rattus Novergicus Strain Wistar) Betina*".

Ketertarikan penulis akan topik ini didasari karena masyarakat kini menggemari makanan cepat saji namun makanan cepat saji tersebut mengandung kadar lemak dan kadar MSG yang tinggi sehingga dikhawatirkan jika dikonsumsi secara berlebihan dan terus-menerus akan menimbulkan masalah kesehatan, tidak terkecuali menimbulkan masalah pada sistem reproduksi wanita. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa kombinasi MSG dan diet tinggi lemak dapat mempengaruhi sistem reproduksi pada wanita.

Dengan selesainya tugas akhir ini, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. dr. Dewi Mustika, M.Biomed, selaku dosen penguji II dan dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, masukan dan saran sehingga tulisan ini dapat diselesaikan.
2. dr. Maya Devi Arifiandi, SpOG, selaku dosen penguji III dan dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, masukan dan saran sehingga tulisan ini dapat diselesaikan.
3. dr. Yhusi Karina Riskawati, M.Sc, selaku dosen penguji I yang telah memberikan masukan dan saran sehingga tulisan ini dapat diselesaikan.

4. Linda Ratna Wati, SST., M.Kes selaku Ketua Program Studi S1 Kebidanan yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di Program Studi S1 Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
6. Kedua orang tua saya yaitu Bapak Agust Dwiandono dan Ibu Sri Sunarti, kakak saya Mbak Grandis dan adik sepupu saya Dek Putri yang telah memberikan doa, semangat dan dukungan sehingga saya bisa menyelesaikan tugas akhir ini dengan baik dan lancar.
7. Teman-teman penelitian “Geng Micin” (Rizka, Kade, Cika dan Elissa) yang sudah bersama-sama melakukan penelitian dan memberikan semangat untuk menyelesaikan tugas akhir ini.
8. Seluruh teman-teman Kebidanan 2014 Kelas B, terutama untuk Tuqqia Lovers (Pita, Rizka, Kade, Eca, Cika, Elissa) yang sudah membuat cerita-cerita indah selama menempuh pendidikan S1 Kebidanan.

Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis menerima setiap saran dan kritik yang membangun. Semoga tulisan ini dapat memberi manfaat bagi pembaca serta semua pihak yang membutuhkan.

Malang, 1 Maret 2018

Penulis

ABSTRAK

Andani, Nurul Putri. 2018. ***Pengaruh Kombinasi MSG dan Diet Tinggi Lemak terhadap Siklus Estrus pada Tikus Putih (Rattus novergicus Strain Wistar) Betina***. Tugas Akhir, Program Studi S1 Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Dewi Mustika, M.Biomed, (2) dr. Maya Devi Arifiandi, SpOG

Efek negatif gaya hidup terkait kesehatan yang muncul adalah meningkatnya obesitas dan konsumsi makanan cepat saji yang dapat mempengaruhi fertilitas. Obesitas seringkali dikaitkan dengan konsumsi diet tinggi lemak yang berlebihan dan makanan cepat saji dikaitkan dengan kandungan penyedap rasa atau *Monosodium Glutamate* (MSG) yang tinggi. Diet tinggi lemak (DTL) dan MSG secara terpisah telah terbukti dapat mempengaruhi infertilitas dan organ reproduksi wanita, namun belum diteliti pengaruh kombinasi MSG dan diet tinggi lemak terhadap reproduksi wanita khususnya ke siklus estrus tikus yang analog dengan siklus menstruasi manusia. Perubahan siklus estrus yang teramati dapat menjadi tanda adanya gangguan produksi hormon reproduksi. Penelitian ini dilakukan selama 56 hari dan menggunakan tikus *Rattus novergicus* strain Wistar betina yang dibagi ke 6 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol +1 DTL, kontrol +2 MSG (0,7 mg/grBB), P1 (DTL + MSG 0,05 mg/grBB), P2 (DTL + MSG 0,2 mg/grBB), P3 (DTL + MSG 0,35 mg/grBB). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan jumlah siklus estrus selama 56 hari antara kelompok perlakuan kombinasi MSG dan DTL dengan kelompok kontrol positif maupun kelompok negatif ($p = 0,673$). Rata-rata sejumlah 25-50% sampel dari semua kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan kombinasi MSG dan DTL menunjukkan pemanjangan siklus estrus. Selain itu kombinasi MSG dan DTL dapat memunculkan siklus estrus yang ireguler pada 25-50% sampel pada siklus ke-1 hingga siklus ke-6, namun menjadi reguler kembali pada siklus ke-7 hingga siklus ke-14.

Kata kunci: MSG, diet tinggi lemak, siklus estrus

ABSTRACT

Andani, Nurul Putri. 2018. ***Effect of Combination MSG and High Fat Diet on Estrous Cycle of Rattus novercigus Strain Wistar Female Rats***. Final Assignment. Bachelor of Midwifery Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Dewi Mustika, M.Biomed, (2) dr. Maya Devi Arifiandi, SpOG

The negative health-related lifestyle effects that arise are the increasing obesity and consumption of fast food that can affect fertility. Obesity is often associated with excessive consumption of high-fat diets (HFD) and fast food is associated with high flavor content or Monosodium Glutamate (MSG). HFD and MSG separately have been shown to affect infertility and female reproductive organs, but have not studied the effect of combination of MSG and HFD on women's reproduction especially to the rat estrous cycle analogous to the human menstrual cycle. Observed changes in estrous cycle can be a sign of a disruption of reproductive hormone production. The study was conducted for 56 days and used the female *Rattus novercigus wistar* strains were divided into 6 groups: negative control, control +1 HFD, control +2 MSG (0.7 mg/grBB), P1 (HFD + MSG 0.05 mg/grBB), P2 (HFD + MSG 0.2 mg/grBB), P3 (HFD + MSG 0.35 mg/grBB). The results showed that there was no significant difference in the number of estrous cycles between treatment groups of MSG and HFD combination with positive control and negative control ($p = 0.673$). An average of 25-50% of samples from all positive control groups and combination treatment groups of MSG and DTL showed an elongation of the estrous cycle. Furthermore, the combination of MSG and DTL can lead an irregular estrous cycle at 25-50% of samples in the 1st cycle to the 6th cycle but become regular again in the 7th cycle to the 14th cycle.

Key words: MSG, high-fat diet, estrous cycle

DAFTAR ISI

Halaman

Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Halaman Abstrak	vi
Halaman <i>Abstract</i>	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	x
Daftar Tabel	xii
Daftar Singkatan	xiii
Daftar Lampiran	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 MSG	6
2.1.1 Pengertian MSG	6
2.1.2 Asam Glutamat	7
2.1.3 Pengaruh MSG terhadap Sistem Reproduksi	8
2.2 Diet Tinggi Lemak	10
2.2.1 Pengertian Diet Tinggi Lemak	10
2.2.2 Pengaruh Diet Tinggi Lemak terhadap Sistem Reproduksi	11
2.3 Ovarium	14
2.3.1 Fungsi Ovarium	14
2.3.2 Siklus Ovarium	14
2.4 Hewan Coba	16
2.4.1 Tikus <i>Rattus norvegicus</i> Strain Wistar	16
2.4.2 Siklus Estrus	18
2.4.3 Cara Pemeriksaan Siklus Estrus	26
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
3.1 Kerangka Konsep	29
3.2 Hipotesis	31
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian	33
4.2 Populasi dan Sampel	33
4.2.1 Kriteria Inklusi	34



4.2.2 Kriteria Eksklusi	34
4.3 Waktu Penelitian	35
4.4 Variabel Penelitian	35
4.4.1 Variabel Terikat (<i>dependent</i>)	35
4.4.2 Variabel Bebas (<i>independent</i>)	35
4.4.3 Variabel Kendali	35
4.5 Definisi Operasional.....	35
4.6 Alat dan Bahan Penelitian	37
4.7 Prosedur Penelitian/ Pengumpulan Data	38
4.7.1 Prosedur Aklimatisasi Hewan Coba	38
4.7.2 Proses Pemeliharaan Hewan Coba	38
4.7.3 Pemberian MSG Pada Hewan Coba	39
4.7.4 Pembuatan Diet Tinggi Lemak	40
4.7.5 Pembuatan Diet Normal	41
4.7.6 Prosedur Pengerjaan Preparat Sitologi	42
4.8 Analisis Data	42
4.9 Skema Alur Penelitian	43
BAB 5 HASIL PENELITIAN	
5.1 Analisis Jumlah Siklus Estrus	44
5.2 Analisis Durasi Tiap Fase Siklus Estrus	47
5.3 Analisis Jumlah Hari Tiap Fase Siklus Estrus	49
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Pembahasan	51
BAB 7 KESIMPULAN	
7.1 Kesimpulan.....	56
7.2 Saran.....	56
Daftar Pustaka	57
Lampiran	63



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur Kimia MSG	6
Gambar 2.2 Hormon Reproduksi Selama Siklus Menstruasi Wanita.....	15
Gambar 2.3 Tikus Galur Wistar.....	18
Gambar 2.4 Hormon Reproduksi Selama Siklus Estrus Tikus	19
Gambar 2.5 Gambaran Pada Preparat Hapusan Vagina pada Fase Proestrus.....	20
Gambar 2.6 Gambaran <i>Vaginal Open</i> Pada Fase Proestrus.....	21
Gambar 2.7 Gambaran Pada Preparat Hapusan Vagina Pada Fase Estrus	22
Gambar 2.8 Gambaran <i>Vaginal Open</i> Pada Fase Estrus.....	22
Gambar 2.9 Gambaran Pada Preparat Hapusan Vagina Pada Fase Metestrus	23
Gambar 2.10 Gambaran <i>Vaginal Open</i> Pada Fase Metestrus	24
Gambar 2.11 Gambaran Pada Preparat Hapusan Vagina Pada Fase Diestrus.....	25
Gambar 2.12 Gambaran <i>Vaginal Open</i> Pada Fase Diestrus.....	25
Gambar 2.13 Cara Memegang Tikus Untuk Penilaian <i>Vaginal Open</i> Dan Pengumpulan Lendir Vagina Untuk <i>Vaginal Swab</i>	26
Gambar 2.14 Pengambilan Spesimen Lendir Vagina Pada Tikus.....	27
Gambar 2.15 Pengambilan Spesimen Lendir Vagina Pada Tikus.....	28
Gambar 5.1 Gambaran Pada Preparat Apusan Vagina Tikus Dengan Pewarnaan Giemsa Dan Perbesaran Mikroskop 40x	44



Gambar 5.2 Perbandingan Rata-Rata Jumlah Siklus Estrus Selama
Perlakuan..... 45

Gambar 5.3 Jumlah siklus estrus selama 56 hari pada tiap sampel di kelompok
perlakuan 46

Gambar 5.4 Rata-rata Jumlah hari tiap fase siklus estrus..... 49



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Parameter Fisiologis Reproduksi dan Biologis Tikus Putih	17
Tabel 4.1 Konversi Perhitungan Dosis dari Manusia Terhadap Tikus	40
Tabel 5.1 Uji Tukey HSD Rata-rata Jumlah Siklus Estrus yang Terjadi selama 56 hari	46
Tabel 5.2 Durasi Tiap Fase Siklus Estrus (hari)	47
Tabel 5.3 Rata-rata Jumlah Hari Tiap Fase Siklus Estrus	49



DAFTAR SINGKATAN

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor

CMC: Carboxy Methyl Cellulose

DNA: Deoxyribonucleic Acid

FSH: Follicle-Stimulating Hormone

GnRH: Gonadotropin-releasing Hormone

HFD: High Fat Diet

HPG axis: Hipotalamus-Pituitary-Gonadotropin axis

KA: kainite receptor

LH: Lutenizing Hormone

MSG: Monosodium Glutamate

NMDA: N-methyl-D-aspartate receptor

PUFA: Poliunsaturated Fatty Acid

ROS: Reactive Oxygen Species

SFA: Saturated Fatty Acids

SHBG: Sex Hormone Binding Globulin

VHFD: Very High Fat Diet



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Laik Etik.....	62
Lampiran 2. Formulir Etik Penelitian Kesehatan	63
Lampiran 3. Analisa Data	67
Lampiran 4. Dokumentasi Selama Penelitian.....	69



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

MSG (*Monosodium Glutamate*) merupakan garam sodium dari asam glutamat (Nwajei *et al.*, 2015). MSG biasa digunakan sebagai bahan penyedap rasa hampir di seluruh dunia. MSG dapat memperkuat rasa dan membuat makanan menjadi lebih lezat. Rata-rata konsumsi MSG di dunia melebihi 67,5 juta kg/tahun (Esminger, 1995). Rata-rata estimasi asupan MSG di negara-negara berkembang adalah 0,3 – 4 gram/ hari (Ibegbulem *et al.*, 2016). Hal yang paling mengkhawatirkan adalah makin tingginya penggunaan MSG di industri makanan saat ini. Walaupun kadar MSG di setiap makanan masih dalam batas aman, namun tetap menjadi berbahaya jika seseorang sering mengonsumsi makanan yang mengandung MSG (The Natural Health Place, 2008).

Pada penelitian oleh Megawati (2005) disebutkan bahwa MSG dapat menyebabkan terganggunya sistem hormon pada tikus. Terganggunya sistem hormonal inilah yang menyebabkan gangguan pada sistem reproduksi yang risikonya antara lain menimbulkan perubahan pola siklus estrus pada tikus. Terganggunya siklus estrus pada tikus merupakan pertanda jika terdapat perubahan-perubahan pada ovarium tikus tersebut. Kemudian terdapat dugaan hubungan MSG yang dapat memicu obesitas melalui peningkatan palatabilitas makanan dan mengganggu sinyal hipotalamus terhadap leptin (He, *et al.*, 2011). MSG meningkatkan palatabilitas makanan dengan cara meningkatkan stimulasi

reseptor *oro-sensory* sehingga membuat nafsu makan meningkat dan memicu peningkatan berat badan (Oladipo, 2015).

Namun terdapat masalah pada penelitian efek MSG sebelumnya yaitu peneliti sebelumnya memberikan dosis tinggi MSG pada tikus, yaitu 0,7 mg/gram BB tikus (Megawati, 2005). Hal tersebut tentu membuat hasil penelitiannya akan teramati perubahan yang signifikan pada tikus. Belum ada penelitian yang memberikan dosis pada tikus yang sebanding dengan konsumsi MSG rata-rata oleh manusia per harinya.

Tren di masyarakat saat ini adalah meningkatnya konsumsi makanan cepat saji yang tidak hanya memiliki kandungan MSG yang tinggi namun juga memiliki kandungan lemak yang tinggi. Konsumsi diet tinggi lemak pada beberapa penelitian dapat menyebabkan obesitas pada manusia (Boozer *et al.*, 1995; Ghibaudi *et al.*, 2002). Obesitas dapat mempengaruhi semua organ di tubuh, termasuk mempunyai pengaruh terhadap sistem reproduksi (Balasubramanian *et al.*, 2012). Namun masih sulit menjelaskan mengenai mekanisme bagaimana obesitas mempengaruhi sistem reproduksi. Ada pendapat bahwa obesitas mengganggu hormon reproduksi wanita sehingga menyebabkan anovulasi (Dağ, 2015).

Lemak merupakan salah satu bahan pembentuk dari hormon-hormon yang ada di dalam tubuh. Selain itu, di jaringan lemak pula juga terjadi proses aromatisasi testosteron (androgen) menjadi estradiol (estrogen). Sehingga kebanyakan penelitian membuktikan bahwa diet tinggi lemak mempengaruhi perubahan sistem hormon, terutama pada hormon reproduksi (Pasquali, 2003). Penelitian oleh Lie *et al.*, (2013) menunjukkan bahwa pemberian diet tinggi lemak selama 40 hari menyebabkan siklus estrus hewan menjadi ireguler.

Sudah ada penelitian sebelumnya yang melihat efek kombinasi MSG dengan diet tinggi lemak. Penelitian oleh Collison *et al.*, (2010) meneliti tentang efek kombinasi MSG yang dicampur pada minum tikus dengan diet tinggi lemak. Hasil penelitiannya menyebutkan bahwa perlakuan tersebut meningkatkan kadar lemak sentral, merangsang kondisi dislipidemia dan merusak suatu area pada otak yang berhubungan dengan kemampuan kognitif pada tikus. Namun belum ada penelitian yang meneliti efek kombinasi MSG dan diet tinggi lemak pada sistem reproduksi, salah satunya yaitu pada siklus estrus.

Siklus menstruasi pada manusia analog dengan siklus estrus pada tikus (Caligioni, 2009). Perubahan pada siklus estrus yang teramati pada tikus dapat mengindikasikan adanya gangguan pada produksi hormon reproduksi di aksis hipotalamus-pituitari-ovarium (Goldman *et al.*, 2007).

Terdapat dugaan bahwa pemberian MSG dosis rendah yang dikombinasikan dengan diet tinggi lemak mempunyai efek yang sama atau bahkan lebih parah dibandingkan dengan pemberian MSG dosis tinggi dan diet tinggi lemak secara terpisah. Maka dari itu, peneliti ingin mengetahui pengaruh pemberian kombinasi MSG dan diet tinggi lemak terhadap siklus estrus tikus putih (*Rattus norvegicus* Strain Wistar) betina.

1.2 Rumusan Masalah

Adakah pengaruh pemberian kombinasi MSG dan diet tinggi lemak terhadap siklus estrus pada tikus putih (*Rattus norvegicus* Strain Wistar) betina?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui adanya pengaruh pemberian kombinasi MSG dan diet tinggi lemak terhadap siklus estrus pada tikus putih (*Rattus norvegicus* Strain Wistar) betina.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan munculnya siklus estrus yang ireguler (terjadi pemanjangan siklus) pada hewan coba yang diberi kombinasi MSG dan diet tinggi lemak.
2. Membuktikan bahwa semakin tinggi dosis MSG yang dikombinasikan dengan diet tinggi lemak, maka akan semakin panjang siklus estrus pada hewan coba.

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

1. Menambah pengetahuan pembaca mengenai efek yang dapat ditimbulkan akibat pemberian kombinasi MSG dan diet tinggi lemak terhadap siklus menstruasi wanita.
2. Dapat digunakan sebagai literatur penunjang untuk penelitian berikutnya mengenai efek samping pemberian kombinasi MSG dan diet tinggi lemak terhadap keteraturan siklus menstruasi, khususnya di program studi S1 Kebidanan Universitas Brawijaya.

1.4.2 Manfaat Klinis

1. Menambah pengetahuan mengenai efek asupan makanan yang tinggi lemak dan MSG terhadap sistem reproduksi serta dapat menjadi dasar untuk KIE terhadap wanita pra konsepsi untuk tetap menjaga asupan makannya agar sistem reproduksinya tidak terganggu.



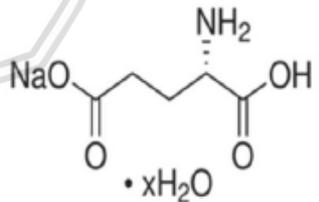
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 MSG

2.1.1 Pengertian MSG

MSG (*Monosodium Glutamate*) atau garam sodium *L-glutamic acid* merupakan salah satu zat aditif yang paling sering digunakan sebagai penambah rasa makanan. MSG adalah garam natrium glutamat dan secara sederhana tersusun dari 78% glutamat, 22% natrium dan air (Sharma *et al.*, 2015). Struktur kimia, susunan kimia dan berat molekul dapat dilihat di gambar 2.1. MSG adalah hasil dari purifikasi glutamat atau gabungan dari beberapa asam amino dengan sejumlah kecil peptida yang dihasilkan dari proses hidrolisa protein. Asam glutamat digolongkan pada asam amino non esensial karena tubuh manusia dapat menghasilkan asam glutamat sendiri (Septadina, 2014).

Monosodium glutamate (E621) Molecular Formula : $C_5H_8NNaO_4 \cdot xH_2O$ Molecular weight : 169,11 g/mol	
--	---

Gambar 2.1 Struktur Kimia MSG (Ataseven *et al.*, 2016)

MSG telah diproduksi di banyak negara di seluruh dunia melalui proses fermentasi alami menggunakan *molasses* (sirup gula) dari gula tebu atau gula bit. Namun saat ini pembuatan MSG rata-rata menggunakan fermentasi bakteri. Rata-rata estimasi asupan MSG di negara-negara berkembang adalah 0,3 - 1

gram/hari (Geha *et al.*, 2000). Konsumsi MSG yang berlebihan akan terakumulasi di dalam darah.

2.1.2 Asam Glutamat

Asam glutamat adalah salah satu asam amino yang sangat banyak ditemui di alam dan tersedia dalam bentuk glutamat bebas atau telah berikatan dengan asam amino lain di dalam protein. Protein hewani mengandung sekitar 11-22% dan pada protein nabati terkandung sekitar 40% glutamat. Asam glutamat banyak tersedia di banyak makanan, seperti tomat, kentang, jamur, ikan, rumput laut, kepiting, daging dan keju (Sharma *et al.*, 2015).

Glutamat adalah satu dari asam amino yang umum ditemukan di alam dan merupakan komponen utama dari banyak protein dan peptida di jaringan di tubuh. Glutamat juga mempunyai peran penting dalam metabolisme tubuh (Alalwani, 2014). Glutamat berperan sebagai neurotransmiter yang menyebabkan sel-sel neuron yang ada di otak dapat berkomunikasi antara satu dengan lainnya, sebagai sumber energi untuk beberapa jaringan tertentu dan sebagai substrat di *glutathione synthesis* (Sharma *et al.*, 2015). Di otak, glutamat endogen berfungsi sebagai neurotransmiter eksitator yang menyebabkan depolarisasi neuron (Appaiah, 2010). Ada dua tipe dasar reseptor glutamat pada otak, yaitu ionotropik dan metabotropik (mGluR). Reseptor jenis ionotropik (terkait kanal ion) ada tiga, yaitu *N-methyl-D-aspartate receptor* (NMDA), *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor* (AMPA) dan *kainite receptor* (KA) (Ebaid and Tag, 2012).

Pada otak, ada beberapa area otak yang normalnya tidak mempunyai sistem barrier, yang disebut organ circumventricular. Area tersebut meliputi

hipotalamus, organ subfornikal, organium vasculosum, area postrema, kelenjar pineal dan organ subcommisural. Dari organ-organ tersebut, terdapat organ yang sangat penting yaitu hipotalamus karena hipotalamus mempunyai peran kontrol utama untuk semua regulasi neuroendokrin, siklus bangun dan tidur, kontrol emosi, regulasi asupan kalori, regulasi sistem imun dan sisten syaraf otonom. Menariknya, glutamat adalah neurotransmitter yang paling penting di hipotalamus (Nayanatara, 2009).

2.1.3 Pengaruh MSG dengan Sistem Reproduksi

Asam glutamat bebas bersifat eksitotoksik bagi otak jika terakumulasi di sinaps (celah antar sel saraf). Otak memiliki banyak reseptor untuk asam glutamat dan di beberapa area (contohnya hipotalamus) namun tidak mempunyai *barrier blood-brain* yang tertutup (Sharma *et al.*, 2015).

Pengolahan sintesis glutamat menghasilkan suatu zat yang bersifat eksitotoksin yang jika dikonsumsi secara berlebihan akan menyebabkan peningkatan konsentrasi glutamat pada darah yang dapat berubah menjadi radikal hidroksil (OH) dan menginduksi terjadinya stres oksidatif (Jinap *et al.*, 2010).

Neurotoksisitas akan merangsang aktivasi berlebihan pada reseptor glutamat yang membuat sel kelebihan kalsium di intraseluler yang mengakibatkan kematian sel (Ebaid and Tag, 2012). Neurotoksisitas dan eksitotoksisitas juga dapat menimbulkan berbagai macam penyakit neurodegeneratif setelah mengonsumsi glutamat dalam bentuk MSG dalam konsentrasi yang tinggi (Gill *et al.*, 2000; Pavlovic *et al.*, 2007)

Kemampuan glutamat untuk merusak sel syaraf di hipotalamus merupakan petunjuk pada fakta bahwa MSG dapat mengubah kontrol sekresi dari hormon reproduksi melalui poros hipotalamus-pituitari-ovarium. Perubahan hormon ini secara langsung akan berpengaruh pada kemampuan sistem reproduksi itu sendiri (Igwebuike *et al.*, 2011). MSG memicu pembentukan oksigen radikal bebas dan berhubungan dengan *Reactive Oxygen Species* (ROS), bentukan ini berbahaya untuk sistem tubuh jika bereaksi dengan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*), protein dan lipid dan menyebabkan kerusakan seluler (Mustafa, 2015).

Pemberian MSG secara umum akan berpengaruh pada mekanisme kerja hipotalamus yang mengakibatkan GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*) turun diikuti dengan kadar FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*) dan LH (*Lutenizing Hormone*), sehingga menimbulkan gangguan pada keseimbangan estrogen dan progesteron (Umami, 2014).

Penelitian oleh Megawati (2005) menunjukkan pemberian MSG dapat memendekkan fase diestrus dan memperpanjang fase proestrus dan estrus pada hewan coba. Kemudian dosis pemberian MSG sebanyak 140mg/ 200 gr BB menyebabkan penurunan jumlah folikel sekunder, folikel tersier dan korpus luteum secara signifikan. Efek lainnya adalah terganggunya zona granulosa. Sel granulosa bertugas untuk memproduksi hormon dan menyuplai makanan untuk sel telur. Jika sel granulosa terganggu, maka sel telur banyak yang mati sehingga banyak folikel menjadi atretik.

Penelitian terbaru dilakukan oleh Eweka *et al.*, (2007) yang memberikan MSG pada tikus wistar dengan dosis 8 gram menyebabkan beberapa perubahan pada gambaran histologis ovarium berupa hipertrofi sel, dan degenerasi serta

atrofi pada lapisan sel granulosa. Penemuan ini membuktikan bahwa dengan dosis yang lebih tinggi akan memberikan pengaruh buruk terhadap perkembangan oosit bahkan infertilitas. Pada penelitian ini juga memberikan gambaran kemungkinan bahwa MSG bertindak sebagai toksin terhadap oosit dan folikel di dalam ovarium.

2.2 Diet Tinggi Lemak

2.2.1 Pengertian Diet Tinggi Lemak

Diet tinggi lemak merupakan salah satu penyebab utama yang dapat mengawali penumpukan massa lemak yang berlebihan, yang dimana akan mengakibatkan sindrom metabolik seperti dislipidemia. *High fat diet* (HFD) ini dibuat untuk menghasilkan keadaan dislipidemia pada hewan coba (Shreya *et al.*, 2011). Pada jurnal dari Hariri *et al.*, (2010) menjelaskan di beberapa penelitian yang dilakukan pada manusia disebutkan bahwa diet tinggi lemak ($\geq 30\%$ energi dari lemak) dapat dengan mudah meningkatkan obesitas.

Biasanya diet tinggi lemak mengandung tidak lebih dari 30-78% dari total energi *intake* yang digunakan (Buettner *et al.*, 2007). Terdapat penelitian yang disebutkan di jurnal Hariri *et al.*, (2010) bahwa faktor penting untuk membuat tikus menjadi obesitas yaitu profil asam lemak daripada jumlah energi dari lemak tersebut. Tidak hanya dari jumlah lemak yang terkandung, namun juga faktor jenis lemak yang digunakan sehingga dapat membuat obesitas (Moussavi *et al.*, 2008), hal tersebut dikarenakan tidak semua jenis lemak bersifat obesogenik. Disebutkan bahwa lemak SFA (*saturated fatty acids*) atau lemak jenuh bersifat lebih obesogenik sehingga lebih mudah menyebabkan

obesitas daripada lemak PUFA (*polyunsaturated fatty acid*) atau lemak tak jenuh (Hariri *et al.*, 2010).

Faktor penting untuk mendesain hewan coba agar berhasil membuat hewan coba menjadi obesitas adalah diet tinggi lemak mencukupi kebutuhan minimal nutrisi hewan tersebut khususnya protein, vitamin dan mineral untuk mengurangi kemungkinan dari konsumsi berlebih untuk memenuhi kebutuhan nutrisi tersebut (Hariri *et al.*, 2010). Marques *et al.*, (2016) menyebutkan bahwa diet tinggi lemak terbukti meningkatkan proses pencernaan energi, penambahan berat badan, massa lemak dan mengurangi konsumsi air pada tikus jenis Wistar dan Spargue-Dawley; dan membuktikan bahwa hewan coba yang paling cepat memperlihatkan efek saat diberi perlakuan diet tinggi lemak adalah tikus jenis Wistar.

2.2.2 Pengaruh Diet Tinggi Lemak terhadap Sistem Reproduksi

Pemberian diet tinggi lemak dapat menyebabkan obesitas. Namun masih sulit untuk menjelaskan mekanisme obesitas yang dapat mempengaruhi sistem reproduksi karena hal tersebut sangat kompleks dan multifaktor. Resistensi insulin, peningkatan kadar leptin dan hiperandrogenemia terjadi pada wanita obesitas. Perubahan kadar lemak dan *Hipotalamus-Pituitary-Gonadotropin axis* (*HPG axis*) dan steroidogenesis pada wanita obesitas berpengaruh pada sistem reproduksi (Dag, 2015).

Diet tinggi lemak membuat jumlah adiposa meningkat. Lebih lanjut, *adipoinular axis* mungkin terpengaruh dengan peningkatan jumlah adiposa, dimana akan memicu peningkatan pelepasan insulin dan leptin yang akan menyebabkan penurunan level SHBG (*Sex Hormone Binding Globulin*), dan

berlanjut menimbulkan peningkatan bioavailabilitas estrogen dalam darah (Kieffer *et al.*, 2000; Cerf, 2007). Resistensi insulin akibat diet tinggi lemak juga menyebabkan berbagai hal, yaitu merangsang steroidogenesis, meningkatkan produksi androgen dari sel teka dan meningkatkan produksi estrogen dari sel granulosa. Peningkatan steroidogenesis ini akan mengakibatkan atresia folikel prematur. Peningkatan produksi androgen dan estrogen namun menurunnya sintesis SHBG membuat peningkatan androgen dan estrogen bebas di dalam darah dan membuat keadaan hiperandrogenemia dan hiperestrogenemia. Selain itu saat kadar leptin secara drastis meningkat akan mengganggu sistem reproduksi yaitu penurunan availabilitas leptin di sistem syaraf pusat yang berakibat pada gangguan pelepasan GnRH oleh hipotalamus dan sehingga siklus reproduksi menjadi tidak teratur (Chakraborty *et al.*, 2016).

Suatu penelitian memperlihatkan peningkatan estrogen pada tikus yang diberi perlakuan VHFD (*very high fat diet*), peningkatan estrogen tersebut diduga karena peningkatan jaringan adiposa dimana jaringan adiposa memproduksi enzim aromatase, atau yang disebut juga estrogen sintetase, sehingga meningkatkan perubahan dari testosteron ke estradiol (Jasik&Lustig, 2008). Peningkatan produksi estrogen akibat jumlah lemak yang berlebihan diduga dapat mengganggu keseimbangan hormon di dalam tubuh yang selanjutnya menimbulkan gangguan siklus menstruasi (Pasquali, 2003). Gangguan siklus menstruasi karena adanya gangguan umpan balik antara estrogen dan GnRH. Kadar estrogen yang terus tinggi akan menekan produksi FSH dan LH. Penurunan produksi FSH dapat menyebabkan gangguan pematangan folikel dan membuat tidak terjadinya ovulasi (Davis J.B., *et al.*, 2009), sedangkan penurunan kadar LH akibat peningkatan kadar progesteron dan estrogen menyebabkan

tidak terjadi ovulasi karena tidak adanya lonjakan LH (*LH surge*). Lebih lanjut penurunan hormon FSH dan LH menyebabkan pemanjangan siklus menstruasi dan ketidakteraturan siklus dan memicu penurunan fungsi reproduksi (Chakraborty *et al.*, 2016).

Lebih lanjut, penelitian Lie *et al.*, (2013) membuktikan bahwa paparan diet tinggi lemak pada tikus menyebabkan peningkatan kadar leptin lebih dari 2 kali lipat walaupun tidak ada perubahan berat badan. Balasubramanian *et al.*, (2012) dalam penelitiannya menemukan bahwa terjadi perubahan siklus estrus pada 20% tikus yang *diet-resistant* dan 30% pada tikus yang diinduksi obesitas setelah 42 hari dipapar diet tinggi lemak serta kadar plasma leptinnya meningkat. Disebutkan juga bahwa pemaparan diet tinggi lemak lebih lama selama 180 hari menyebabkan perubahan pola siklus estrus yang parah (durasi siklus dobel) serta peningkatan lemak tubuh dan berat badan. Efek lain yang timbul pada tikus yang dipapar diet tinggi lemak selama 180 hari adalah kurangnya lonjakan LH akibat penurunan kadar LH dan terjadi kenaikan kadar progesteron (Chakraborty *et al.*, 2016).

Dengan demikian, tampak bahwa penurunan kadar LH dengan lonjakan LH berkurang bersamaan dengan peningkatan kadar progesteron dan estradiol menghasilkan pemanjangan siklus estrus menyebabkan berkurangnya reproduksi fungsi. Begitu perubahan ini terjadi, bahkan setelah diet tinggi lemak diganti dengan diet normal, tidak mengubah kerusakan yang telah terjadi pada sistem reproduksi meskipun beberapa parameter metabolik dapat kembali ke tingkat normal. Hal ini menunjukkan bahwa efek samping diet tinggi lemak lebih parah dan tidak dapat diperbaiki pada jaringan reproduksi daripada jaringan lain yang terkena (Chakraborty *et al.*, 2016).

2.3 Ovarium

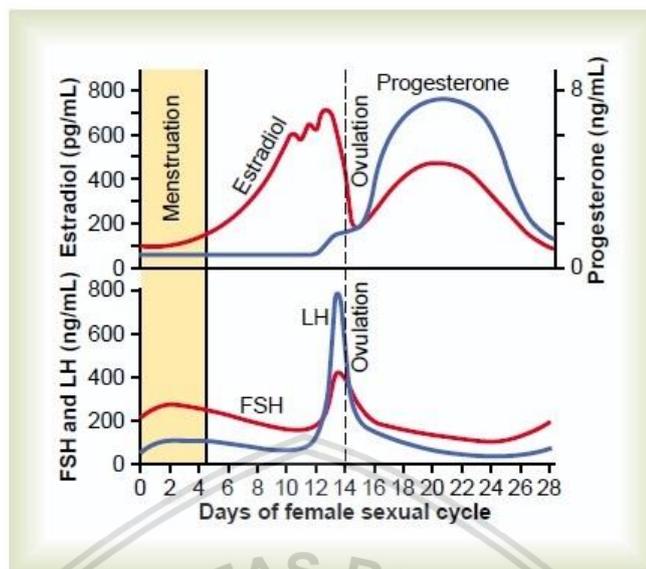
2.3.1 Fungsi Ovarium

Ovarium memiliki dua unit endokrin yang berkaitan, yaitu sel teka dan sel granulosa yang secara kolektif dinamai sel folikel yang akan mengeluarkan estrogen selama fase folikular dan korpus luteum yang menghasilkan progesteron dan sedikit estrogen selama fase luteal. Unit-unit tersebut dipicu oleh hubungan hormonal siklik kompleks antara hipotalamus, hipofisis anterior dan kedua unit endokrin ovarium ini (Sherwood, 2007).

2.3.2 Siklus Ovarium

Setelah seorang perempuan mengalami pubertas, organ ovariumnya akan terus-menerus mengalami dua fase secara bergantian, yaitu fase folikular, yang didominasi oleh keberadaan folikel matang, dan fase luteal, yang ditandai oleh adanya korpus luteum. Normalnya siklus ini berlangsung selama 28 hari dan hanya terinterupsi jika terjadi kehamilan dan akhirnya berakhir pada menopause (Sherwood, 2007).

Fase folikular dimulai dengan perkembangan folikel-folikel primer. Namun hanya satu folikel yang dapat matang dengan bantuan lingkungan hormonal yang mendukung perkembangannya. Folikel lain karena tidak mendapat bantuan hormon akan mengalami atresia. Folikel matang yang siap berovulasi akan menonjol di permukaan ovarium. Pecahnya folikel saat ovulasi menandakan berakhirnya fase folikular dan dimulainya fase luteal (Sherwood, 2007).



Gambar 2.2 Kadar Hormon Reproduksi selama siklus reproduksi wanita (Guyton, 2006)

Hormon yang berperan disini yaitu estrogen, FSH dan LH. Kadar hormon reproduksi selama siklus ovarium ditunjukkan pada gambar 2.2. Hormon FSH dan estrogen memicu proliferasi sel-sel granulosa, sedangkan FSH dan LH diperlukan untuk sintesis dan sekresi estrogen oleh folikel. Kadar estrogen yang meningkat pada fase meningkat menghambat sekresi GnRH untuk menyekresikan FSH dan LH. Penurunan sekresi FSH menyebabkan semua folikel yang sedang berkembang menjadi atresia kecuali folikel yang paling matang (Sherwood, 2007). Hal yang menarik pada fase ini adalah kenaikan kadar FSH 2x lipat dan LH 6-8x lipat secara tiba-tiba di akhir fase folikular yang akan menginduksi ovulasi. Penjelasan yang mungkin mendasari peristiwa tersebut adalah estrogen pada titik ini secara khusus mempunyai efek umpan balik positif dengan GnRH – kontras dengan efek umpan balik negatif yang terjadi di awal fase folikular. Alasan lainnya yaitu mulai disekresikannya hormon progesteron oleh sel granulosa tepat sebelum lonjakan LH diduga menjadi faktor yang menstimulasi lonjakan LH (Guyton, 2006).

Setelah terjadi ovulasi, folikel pecah yang tertinggal di ovum disebut korpus luteum. Korpus luteum menyekresikan hormon progesteron, estrogen dan inhibin. Ketiga hormon tersebut bersama-sama memiliki efek umpan balik negatif pada hipotalamus sehingga menghambat sekresi FSH dan LH. Setelah tidak adanya fertilisasi, lama-kelamaan korpus luteum akan berdegenerasi dan membuat penurunan kadar progesteron dan estrogen. Penurunan kedua hormon tersebut membuat kadar FSH dan LH meningkat kembali dan menginisiasi perkembangan folikel baru. Fase luteal pun berakhir dan dimulailah kembali fase folikular (Guyton, 2006).

2.4 Hewan Coba

2.4.1 Tikus *Rattus novergicus* strain wistar

Penelitian dengan menggunakan tikus galur wistar (*Rattus novergicus*) lebih banyak dilakukan oleh peneliti karena banyak yang menganggap aspek perilaku dan fisiologis tikus lebih relevan dengan manusia dan lebih mudah diamati, mudah dipelihara dibandingkan dengan mencit. Terdapat beberapa galur tikus yang dapat digunakan untuk percobaan yaitu wistar albino, Long-Evans, dan Sprague Dawley, namun yang sering digunakan dalam penelitian adalah tikus wistar albino (Widiartini dkk., 2013).

Terdapat beberapa alasan tikus digunakan sebagai hewan coba karena memiliki sifat-sifat yaitu memiliki daya adaptasi yang baik, fungsi dan bentuk organnya serta proses biokimia dan biofisik antara tikus dan manusia memiliki banyak kemiripan. Tikus dipilih sebagai hewan coba karena penanganan dan pemeliharaannya mudah, biaya yang dibutuhkan tidak mahal, umur relatif pendek, sifat reproduksi menyerupai mamalia besar, lama kebuntingan singkat,

angka kelahiran tinggi, siklus estrus pendek dan karakteristik tiap fase siklus jelas. Hewan ini sebagian besar digunakan untuk penelitian yang bertujuan ilmiah seperti pengaruh obat-obatan, toksisitas, metabolisme, dan embriologi (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Taksonomi tikus putih adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tabel 2.1 Parameter Fisiologis Reproduksi dan Biologis Tikus Putih

Kriteria	Nilai
Fase 1 diestrus	60 jam
Fase 2 proestrus (awal)	60 jam
Fase 3 proestrus (akhir)	12 jam
Fase 4 estrus	10-20 jam
Fase 5 metaestrus	8 jam
Durasi total siklus	4-5 hari
Lama estrus	9-20 jam
Waktu ovulasi	8-11 jam sesudah estrus
Usia lepas sapih	21 hari
Usia pubertas	6-8 minggu
Berat dewasa jantan	300-400 gram
Berat dewasa betina	250-3000 gram
Konsumsi makanan per berat badan/hari	10 g/100g/hari
Konsumsi minum per berat badan/hari	10-12/100g/hari

Sumber: (Partodihardjo, 1992)



Gambar 2.3 Tikus Galur Wistar (Akbar, 2010)

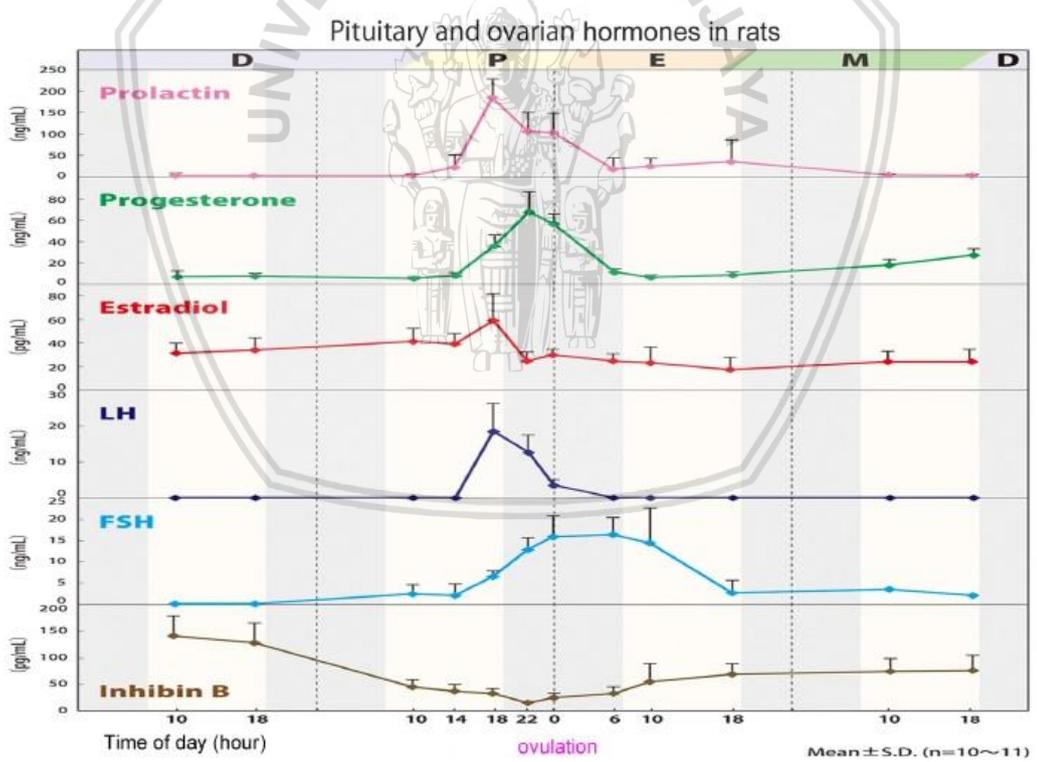
2.4.2 Siklus Estrus

Siklus estrus adalah siklus reproduksi yang terjadi pada mamalia. Pada tikus, durasi siklus estrusnya pendek, yaitu sekitar 4-5 hari. Fase tersebut akan berulang jika tidak ada kehamilan, pseudopregnancy ataupun anestrus (Byers, 2012). Pada tikus, siklus estrus dibagi menjadi 4 fase, yaitu proestrus estrus, metestrus (diestrus I) dan diestrus (diestrus II). Ovulasi dimulai pada awal proestrus hingga akhir dari fase estrus. Singkatnya masa estrus pada tikus inilah yang membuat banyak peneliti menjadikannya subjek penelitian jika ingin meneliti siklus reproduksi (Marcondes *et al.*, 2002).

Selama siklus estrus, kadar prolaktin, LH dan FSH tetap rendah dan akan meningkat pada siang hari pada fase proestrus. Kadar estradiol mulai meningkat saat mulai masuk fase metestrus, mencapai kadar puncak pada fase proestrus dan kembali ke level bawah pada fase estrus. Sekresi progesteron meningkat pada fase metestrus dan turun pada fase diestrus, lalu akan mencapai puncak kedua pada fase akhir proestrus (Marcondes *et al.*, 2002). Grafik kadar hormon-hormon tersebut dapat dilihat pada gambar 2.3.

Kerja sistem reproduksi semua mamalia sangat bergantung pada fungsi kelenjar hipotalamus-pituitari-gonad. Pada mamalia betina, syaraf-syaraf dari

gonadotropin-releasing hormone (GnRH) ada di area septal dan hipotalamus mengirimkan aksonnya ke median utama. Kemudian GnRH merangsang pituitari anterior agar gonadotropin merangsang pengeluaran *lutening hormone* (LH) dan *follicle-stimulating hormone* (FSH). Pada sirkulasi perifer, hormon-hormon tersebut menstimulasi sel spesifik di ovarium sebagai pencetus ovulasi. Folikel di ovarium akan mensekresi estrogen yang akan sampai ke hipotalamus. Selama masa pra-ovulasi, sekresi estrogen mencapai puncaknya dan syaraf-syaraf GnRH terstimulasi. Estrogen berperan untuk regulasi GnRH secara tidak langsung melalui interneuron (Caligiono, 2010).

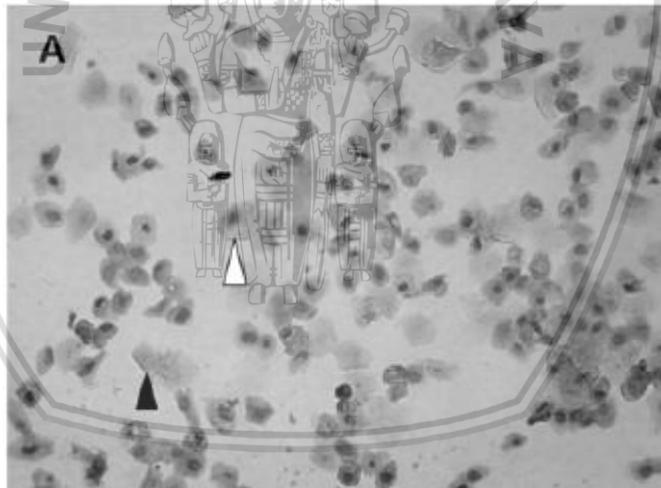


Gambar 2.4 Hormon Reproduksi Selama Siklus Estrus Tikus (Sato et al., 2016)

Berikut adalah ciri-ciri tiap fase pada siklus estrus (Byers *et al.*, 2012; Caligioni, 2010; Akbar, 2010):

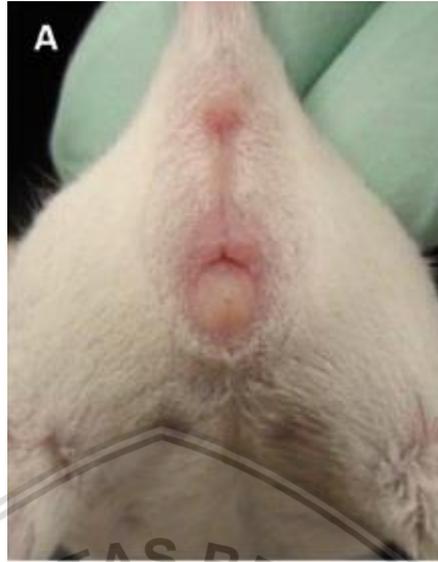
1. Proestrus

Pada fase ini, akan didominasi oleh sel epitel berinti. Sel ini akan nampak secara individu ataupun berkelompok. Kadang-kadang sel bertanduk juga terlihat pada penampang lendir vagina tikus. Stase ini merupakan stase preovulatori dimana kadar estrogen meningkat dan pada malam harinya kadar FSH dan LH naik lalu terjadi ovulasi. Pada pemeriksaan visual, terlihat vagina tikus bengkak, lembab dan berwarna merah muda (gambar 2.5). Vagina tikus terbuka lebar dan terlihat keriput atau lipatan di sisi dorsal dan ventral (gambar 2.6). Fase ini terjadi sekitar 1-2 hari.



Gambar 2.5 Gambaran pada preparat hapusan vagina pada fase proestrus (Byers *et al.*, 2012)

Pada fase ini didominasi oleh adanya sel epitel berinti (panah putih) (Byers *et al.*, 2012).

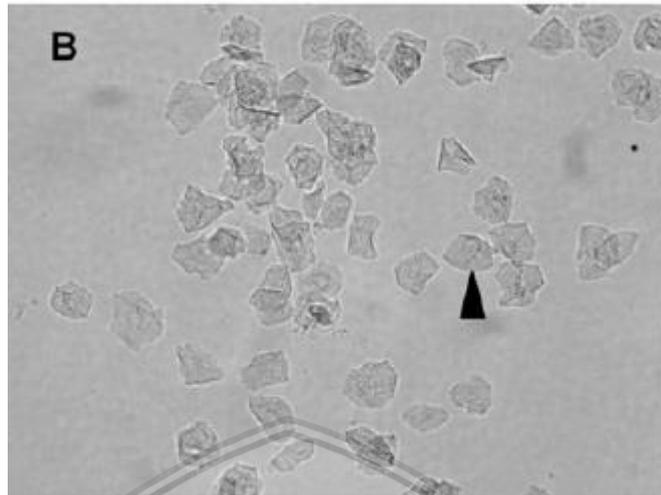


Gambar 2.6 Gambaran *vaginal open* pada fase proestrus (Byers *et al.*, 2012)

Pada fase ini terlihat vagina tikus bengkak, lembab dan berwarna merah muda (Byers *et al.*, 2012).

2. Estrus

Fase ini ditandai dengan terlihatnya sel bertanduk pada penampang lendir vagina tikus dan terlihat bergerombol. Selnya berbentuk iregular, inti sel tidak terlihat dan sitoplasmanya granular (gambar 2.7). Vagina tikus berwarna merah muda namun lebih pudar daripada fase proestrus, bengkak dan kelembapannya juga berkurang (gambar 2.8). Kadar estrogen pada fase ini masih tinggi di pagi hari dan akan menurun ke level dasar di siang harinya. Fase ini merupakan fase ovulasi bagi tikus dan terjadi selama 12 jam.



Gambar 2.7 Gambaran pada preparat hapusan vagina pada fase estrus (Byers *et al.*, 2012)

Pada fase ini didominasi oleh adanya sel epitel tidak berinti (panah hitam) (Byers *et al.*, 2012)

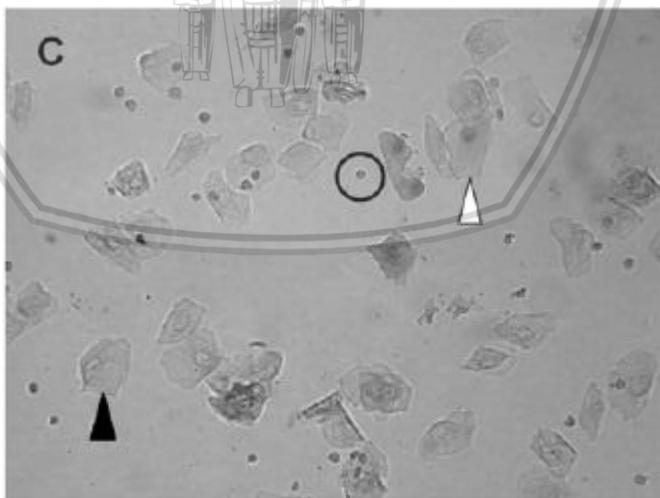


Gambar 2.8 Gambaran *vaginal open* pada fase estrus (Byers *et al.*, 2012)

Pada fase ini terlihat vagina tikus bengkak, lembab dan berwarna merah muda (Byers *et al.*, 2012).

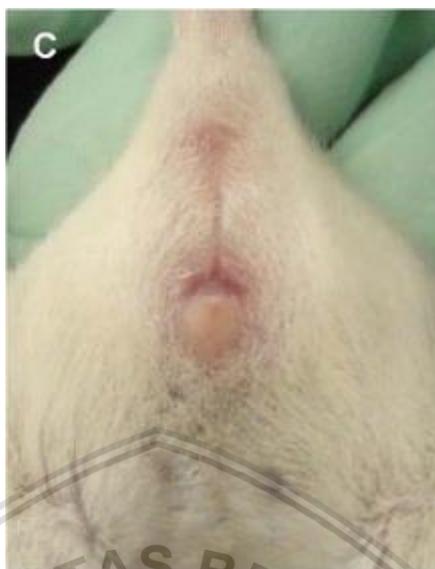
3. Metestrus

Metestrus adalah periode segera sesudah estrus di mana korpus luteum bertumbuh cepat dari sel granulosa folikel yang telah pecah di bawah pengaruh LH dan adenohipofisis. Metestrus sebagian besar berada di bawah pengaruh progesteron yang dihasilkan oleh korpus luteum. Progesteron menghambat sekresi FSH oleh adenohipofisis sehingga menghambat pembentukan folikel de Graaf yang lain dan mencegah terjadinya estrus. Selama metestrus, uterus mengadakan persiapan-persiapan seperlunya untuk menerima dan memberi makan pada embrio. Pada fase ini, terlihat sel-sel yang beragam yang didominasi oleh leukosit dan beberapa sel epitel berinti atau sel bertanduk (gambar 2.9). *Vaginal open* pada fase ini tidak terlalu lebar, tidak membengkak dan ada sedikit sisa-sisa sel putih yang terlihat (gambar 2.10). Kadar estrogen pada fase ini rendah.



Gambar 2.9 Gambaran pada preparat hapusan vagina pada fase metestrus (Byers *et al.*, 2012)

Pada fase ini ditandai dengan adanya sel epitel tidak berinti (panah hitam) dan leukosit (lingkaran hitam) (Byers *et al.*, 2012).

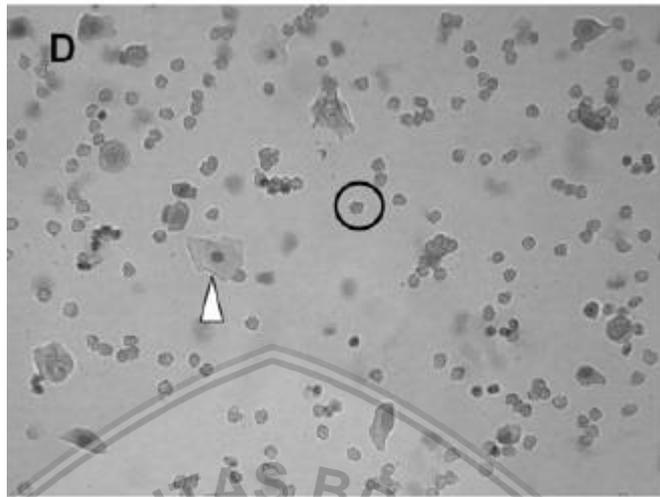


Gambar 2.10 Gambaran *vaginal open* pada fase metestrus (Byers *et al.*, 2012)

Pada fase ini terlihat vagina tidak terlalu lebar, tidak membengkak dan ada sedikit sisa-sisa sel putih yang terlihat (Byers *et al.*, 2012).

4. Diestrus

Fase ini didominasi oleh leukosit (gambar 2.11). Korpus luteum menjadi matang dan pengaruh progesteron terhadap saluran reproduksi menjadi nyata. Endometrium lebih menebal dan kelenjar-kelenjar berhipertrofi. Serviks menutup dan lendir vagina mulai kabur dan lengket. Selaput mukosa vagina pucat dan otot uterus mengendor. Pada akhir periode ini korpus luteum memperlihatkan perubahan-perubahan retrogresif dan vaskularisasi secara gradual. Endometrium dan kelenjar-kelenjarnya beratrofi atau beregresi ke ukuran semula. Mulai terjadi perkembangan folikel-folikel primer dan sekunder dan akhirnya kembali ke proestrus. Vagina tikus menutup dan tidak ada pembengkakan jaringan (gambar 2.12). Selama fase ini, kadar estrogen bersiap-siap untuk meningkat. Fase ini terjadi sekitar 2-3 hari.



Gambar 2.11 Gambaran pada preparat hapusan vagina pada fase diestrus (Byers *et al.*, 2012)

Pada fase ini didominasi oleh leukosit (lingkaran hitam) (Byers *et al.*, 2012).



Gambar 2.12 Gambaran *vaginal open* pada fase diestrus (Byers *et al.*, 2012)

Pada fase ini terlihat Vagina tikus menutup dan tidak ada pembengkakan jaringan (Byers *et al.*, 2012).

2.4.3 Cara Pemeriksaan Siklus Estrus

Cara mengidentifikasi fase siklus estrus pada tikus bisa menggunakan beberapa metode, antara lain metode visual dan metode vaginal swab. Metode visual ini caranya adalah mengevaluasi *vaginal opening* pada tikus. Sedangkan vaginal swab adalah dengan cara mengambil apusan dari sekret vagina tikus lalu diberi pewarnaan Giemsa dan dilihat di mikroskop (Byers *et al*, 2012). Cara memegang tikus



Gambar 2.13 Cara memegang tikus untuk penilaian *vaginal open* dan pengumpulan lendir vagina untuk *vaginal swab* (Caligioni, 2009)

Cara yang tepat untuk memegang tikus untuk analisis pembukaan vagina dan untuk pengumpulan sekresi vagina yaitu dengan menggunakan tangan nondominan, pegang kulit longgar di tengkuk leher antara jempol dan telunjuk dan menahan hewan itu dengan satu tangan. Kemudian balikkan tikus di telapak tangan dan letakkan ekor di antara keempat dan kelima jari pemeriksa (Caligioni, 2009).

Alat dan bahan yang perlu disiapkan untuk memeriksa siklus estrus secara *vaginal swab* yaitu *cotton bud*, *cover glass*, *object glass*, alkohol, NaCL 0,9%, *methylen blue* dan mikroskop. Pegang dan angkat tikus yang akan diperiksa siklus estrusnya. Cara memegang tikus dapat dilihat pada gambar 2.13. Kemudian *cotton bud* yang telah dibahasi larutan NaCL 0,9% dimasukkan ke

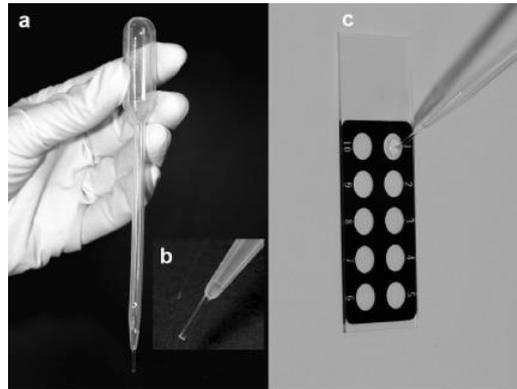
dalam vagina tikus betina dan dilakukan usapan sebanyak 1-2 kali putaran (gambar 2.14). Hasil ulasan dari *cotton bud* tersebut lalu dioleskan pada gelas objek dan dikeringkan (gambar 2.15), kemudian dilakukan pewaranaan pada preparat ulasan. Satu *object glass* digunakan untuk 1 preparat ulasan untuk 1 ekor (Prayogha, 2012).



Gambar 2.14 Pengambilan spesimen lendir vagina pada tikus (Caligioni, 2009)

Setelah tikus dapat dikendalikan pada tangan yang nondominan, usap vagina tikus menggunakan ujung pipet plastik yang diisi larutan NaCL 0,9%/ menggunakan *cotton bud* yang telah dibasahi larutan NaCL 0,9% (Caligioni, 2009).

Preparat ulasan yang telah dikeringkan lalu ditetesi larutan alkohol absolut untuk difiksasi selama 2-3 menit, lalu dikeringkan. Selanjutnya, preparat tersebut ditetesi larutan giemsa selama 5-10 menit, kemudian tuangkan cairan giemsa yang ada di preparat ke tisu dan dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan, kemudian preparat ulasan diamati morfologi sel epitel di bawah mikroskop dengan pembesaran 40x dan kemudian dicatat (Prayogha, 2012).



Gambar 2.15 Pengambilan spesimen lendir vagina pada tikus (Caligioni, 2009)

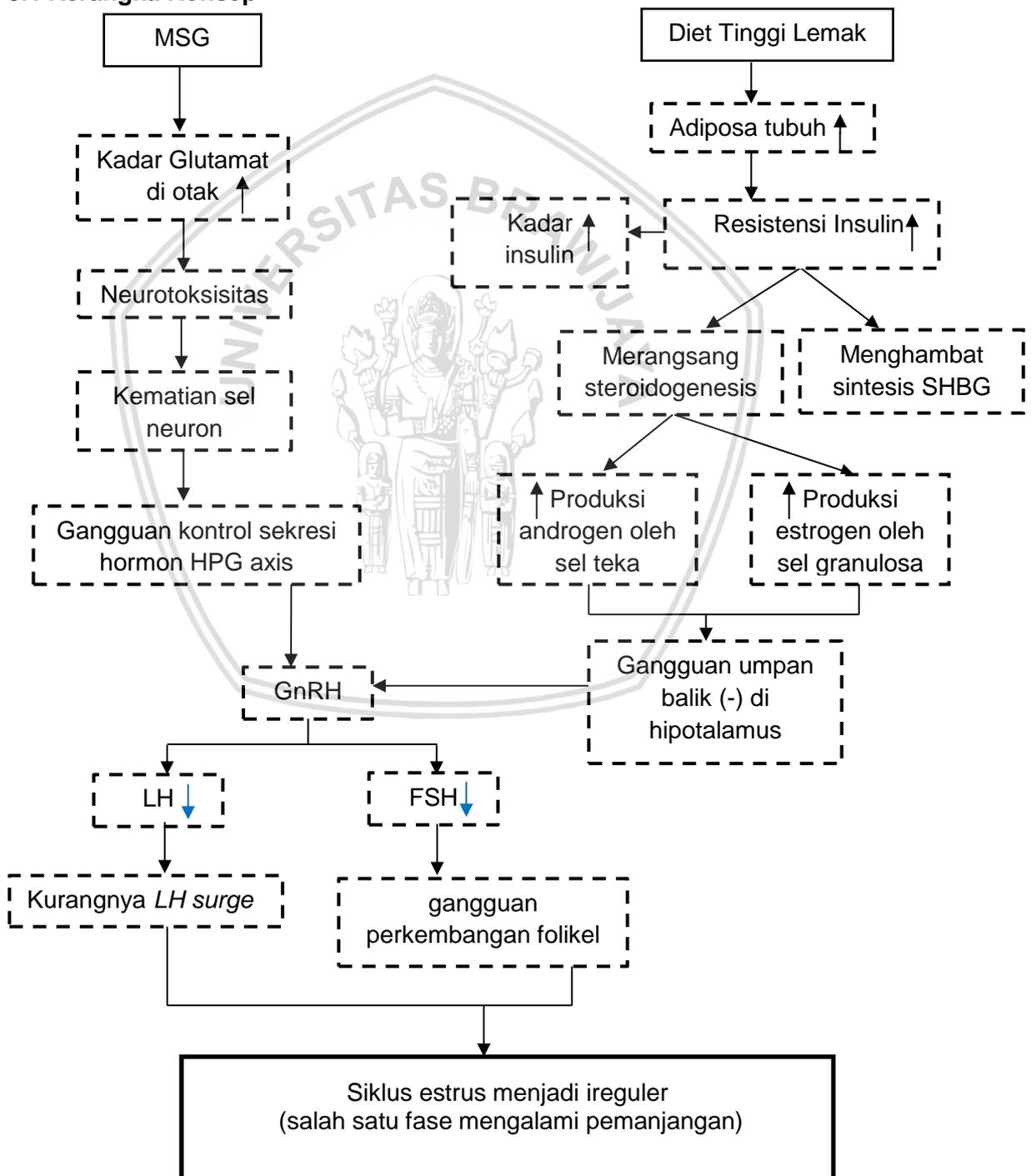
Gambar (a) pipet plastik yang diisi larutan NaCl 0,9%; gambar (b) detail ujung pipet; gambar (c) sekret vagina ditempatkan di *object glass* (Caligioni, 2009).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:



Keterangan kerangka konsep:

Konsumsi MSG dalam jumlah yang berlebih akan mengakibatkan kenaikan kadar glutamat yang selanjutnya akan mengalami neurotoksisitas. Neurotoksisitas akan merangsang aktivasi berlebihan pada reseptor glutamat yang membuat sel kelebihan kalsium di intraseluler yang mengakibatkan kematian sel (Ebaid and Tag, 2012). Kemampuan glutamat untuk merusak sel syaraf di hipotalamus inilah yang dapat mengubah kontrol sekresi dari hormon reproduksi melalui poros hipotalamus-pituitari-ovarium dan lebih lanjut akan menurunkan sekresi hormon FSH dan LH. Perubahan hormon ini secara langsung akan berpengaruh pada kemampuan sistem reproduksi itu sendiri (Igwebuike *et al.*, 2011).

Diet tinggi lemak membuat jumlah adiposa meningkat dan membuat resistensi insulin. Resistensi insulin akibat diet tinggi lemak juga menyebabkan berbagai hal, yaitu merangsang steroidogenesis, menghambat sintesis SHBG, meningkatkan produksi androgen dari sel teka dan meningkatkan produksi estrogen dari sel granulosa. Peningkatan steroidogenesis ini akan mengakibatkan atresia folikel prematur. Peningkatan produksi androgen dan

estrogen namun menurunnya sintesis SHBG membuat peningkatan androgen dan estrogen bebas di dalam darah dan membuat keadaan hiperandrogenemia dan hiperestrogenemia (Chakraborty *et al.*, 2016). Kadar estrogen yang selalu tinggi akan mengganggu proses umpan balik terhadap kadar FSH dan LH pada GnRH (Jasik&Lustig, 2008). Penurunan produksi FSH dapat menyebabkan gangguan pematangan folikel dan membuat tidak terjadinya ovulasi (Davis J.B., *et al.*, 2009), sedangkan penurunan kadar LH akibat peningkatan kadar progesteron dan estrogen menyebabkan tidak terjadi ovulasi karena tidak adanya lonjakan LH (*LH surge*).

MSG dan diet tinggi lemak akan menyebabkan gangguan sekresi hormon FSH dan LH pada GnRH. Penurunan produksi FSH dapat menyebabkan gangguan pematangan folikel dan membuat tidak terjadinya ovulasi (Davis JB, *et al.*, 2009), sedangkan penurunan kadar LH akibat peningkatan kadar progesteron dan estrogen menyebabkan tidak terjadi ovulasi karena tidak adanya *LH surge*. Seperti diketahui bahwa hormon LH sangat berperan pada ovulasi. Akibatnya, fase folikular akan memanjang dan membuat fase proestrus memanjang. Lebih lanjut penurunan hormon FSH dan LH menyebabkan pemanjangan siklus menstruasi dan ketidakteraturan siklus dan memicu penurunan fungsi reproduksi (Chakraborty *et al.*, 2016).

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Hipotesis dalam penelitian ini adalah kombinasi MSG dan diet tinggi lemak menyebabkan siklus estrus pada tikus putih (*Rattus norvegicus* strain wistar) betina menjadi ireguler (terjadi pemanjangan siklus).

2. Hipotesis dalam penelitian ini adalah semakin tinggi dosis MSG yang dikombinasikan dengan diet tinggi lemak maka akan semakin panjang siklus estrus pada tikus putih (*Rattus norvegicus* strain wistar) betina.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah *experimental laboratories (true experiment)* dengan menggunakan jenis *randomized pretest-posttest control group design*. Hewan coba yang digunakan adalah tikus betina jenis *Rattus novergicus* strain wistar.

4.2 Populasi dan Sampel

Subjek penelitian adalah tikus putih jenis strain wistar (*Rattus novergicus*). Jenis kelamin tikus yang digunakan untuk percobaan adalah tikus betina yang belum pernah kawin. Penelitian ini membagi sampel dalam 6 kelompok perlakuan, yaitu:

1. Kelompok Kontrol Negatif (-): tikus wistar yang diberi diet normal 25 gr/hari
2. Kelompok Kontrol Positif (+) 1: tikus yang diberi diet tinggi lemak 25 gr/hari
3. Kelompok Kontrol Positif (+) 2: tikus yang diberi diet normal 25 gr + MSG 0,7 mg/gram BB yang dilarutkan dalam *aquades* 1 ml.
4. Kelompok P1: tikus yang diberi Diet Tinggi Lemak 25 gr/hari+MSG dosis 0,05 mg/ gram BB yang dilarutkan dalam *aquades* 1 ml.
5. Kelompok P2: tikus yang diberi Diet Tinggi Lemak 25 gr/hari+MSG dosis 0,2 mg/ gram BB yang dilarutkan dalam *aquades* 1 ml.
6. Kelompok P3: tikus yang diberi Diet Tinggi Lemak 25 gr/hari+MSG dosis 0,35 mg/ gram BB yang dilarutkan dalam *aquades* 1 ml.

Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Notoadmojo, 2010):

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

p= jumlah perlakuan; n= jumlah ulangan

Pada penelitian ini p = 6 sehingga jumlah pengulangan adalah

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n-6 \geq 15$$

$6n \geq 21$, $n \geq 3,5$ dibulatkan menjadi $n \geq 4$, jadi dilakukan minimal 4 kali

pengulangan untuk masing-masing kelompok.

Untuk setiap perlakuan diberikan penambahan 1 kali pengulangan sebagai cadangan sehingga total sampel yang dibutuhkan sejumlah 30 ekor tikus dengan rincian 5 ekor atau 5 pengulangan.

4.2.1 Kriteria Inklusi

Tikus *Rattus norvegicus* strain wistar betina yang sehat ditandai dengan pergerakan yang aktif, tingkah laku normal, mata berwarna jernih, dan bulu berwarna putih, berusia 6-8 minggu dengan berat badan 140-200 gram dan belum pernah kawin.

4.2.2 Kriteria Eksklusi

Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung, tikus yang tidak mau makan, tikus yang mempunyai siklus estrus yang ireguler (mengalami pemanjangan siklus).

4.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 56 hari di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas (*independent*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian kombinasi MSG dan diet tinggi lemak. Dosis yang diberikan untuk diet tinggi lemak yaitu 25 gr/hari dan dosis untuk MSG adalah 0,05 mg/gram BB/tikus/hari; 0,2 mg/gram BB/tikus/hari; dan 0,35 mg/gram BB/tikus/hari.

4.4.2 Variabel Terikat (*dependent*)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah gambaran siklus estrus pada tikus betina (*Rattus novergicus* strain wistar).

4.4.3 Variabel Kendali

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar obyek penelitian selalu terkendali dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah jenis tikus, umur tikus, jenis kelamin tikus, berat badan tikus, dan kondisi lingkungan kandang.

4.5 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala	Satuan
Hewan Coba	Hewan coba yang digunakan adalah 30 tikus betina jenis <i>Rattus novergicus</i> strain wistar, berumur 6-8 minggu dengan berat badan 140-200 gram, memiliki bulu rata berwarna putih, sehat, mata jernih, bergerak aktif,	Rasio	Ekor

	tingkah laku normal dan belum pernah kawin. Hewan coba dibeli dari Lab Institut Biosains Universitas Brawijaya Malang.		
MSG	MSG yang digunakan adalah <i>L-glutamic acid monosodium salt hydrate</i> 99%. MSG murni diberikan pada hewan coba dengan cara disonde, terlebih dahulu dilarutkan dengan <i>aquades</i> 1 ml dan diberikan dengan dosis 0,05mg/gram BB/tikus/hari; 0,2mg/gram BB/tikus/hari; dan 0,35 mg/gram BB/tikus/hari.	Rasio	mg/ g BB tikus
Diet tinggi lemak	Diet tinggi lemak adalah pakan dengan kandungan lemak tinggi yang diberikan setiap hari pada hewan coba. Diet tinggi lemak dibuat sendiri dengan komposisi untuk 2,5 kg yaitu tepung jagung 550 gram, gula pasir 457,5 gram, korsvet 275 gram, margarin 275 gram, <i>soybean oil</i> 130 gram, gelatin 130 gram, kasein 335 gram, CMC (<i>carboxy methyl cellulose</i>) 132,5 gram, vitamin dan mineral 25 butir, air 375 gram dan asam kolat 5 gram (Reeves, 1997; Handayani, 2012). Diet tinggi lemak yang diberikan 25 gram/hari selama 56 hari.	Rasio	g/ hari
Diet normal	Diet normal yang diberikan pada saat perlakuan memiliki komposisi untuk 1 kg pakan yaitu tepung jagung 615 gram, gula pasir 85 gram, <i>soybean oil</i> 45 gram, gelatin 65 gram, kasein 90 gram, CMC 51 gram, vitamin dan mineral 5 butir, air 750 ml (Reeves, 1997; Handayani, 2012). Diet normal yang diberikan 25 g/hari selama 56 hari.	Rasio	g/ hari
Siklus estrus	Tikus diperiksa siklus estrusnya untuk mengecek apakah tikus mengalami siklus estrus yang reguler atau mempunyai siklus estrus yang ireguler (terjadi pemanjangan siklus). Siklus estrus diperiksa dengan metode <i>vaginal swab</i> , diperiksa 1x sehari yaitu antara pukul 07.00 – 14.00. Pengecekan dilakukan selama 56 hari perlakuan. <i>Vaginal swab</i> merupakan metode untuk mengecek siklus estrus pada tikus dengan cara mengamati morfologi sel dari lendir vagina tikus. Siklus estrus yang reguler mempunyai durasi 4-5 hari dalam 1 siklus dan dalam 56 hari terjadi 12-14 siklus. Siklus estrus yang ireguler yaitu 1 siklus berlangsung lebih dari 5 hari atau dalam 56 hari memiliki jumlah siklus kurang dari 12 siklus.	Rasio	Jam

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

a. Pemeliharaan hewan coba

Alat: Kandang tikus yang berupa box plastik berukuran 15 x 30 x 42 cm sebanyak 30 buah diisi dengan sekam dan ditutup dengan kawat kasa (masing-masing kandang ditempati 1 ekor tikus), tempat minum.

b. Pakan normal untuk aklimatisasi

Alat: Baskom plastik, timbangan, gelas ukur, pengaduk, panci, kotak kontainer makanan.

Bahan: tepung jagung, gula pasir, *soybean oil*, gelatin, kasein, CMC, vitamin dan mineral dan air (Reeves, 1997; Handayani, 2012).

c. Pembuatan pakan pakan tinggi lemak hewan coba

Alat: Baskom plastik, timbangan, gelas ukur, pengaduk, panci, kotak kontainer makanan.

Bahan: tepung jagung, gula pasir, korsvet, margarin, *soybean oil*, gelatin, kasein, CMC, vitamin dan mineral, air dan asam kolat.

d. Pelarutan MSG murni

Alat: wadah, pengaduk.

Bahan: MSG *L-glutamic acid monosodium salt hydrate 99%*, *aquabides*.

e. Pemeriksaan Sitologi

Alat: *Cotton bud*, *object glass*, spuit, mikroskop, tisu, nampan.

Bahan: NaCl 0,9%, alkohol absolut, pewarna Giemsa, *buffer phospat* pH 7.

f. Penyondean Tikus

Alat: spuit 10 cc, sonde tikus

Bahan: *aquabides*

4.7 Prosedur Penelitian/ Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi merupakan prosedur untuk mengadaptasikan hewan coba dengan suasana laboratorium dan menghilangkan stress. Tikus dibiarkan selama 1 minggu di dalam kandang untuk menyesuaikan diri dengan lingkungannya dan diberikan pakan standar (normal) sebanyak 30 g/hari. Pemberian pakan tikus dan minuman diberikan secara *ad libitum*. Hewan coba tikus betina sesuai dengan kriteria inklusi sebanyak 30 ekor dibagi menjadi 6 kelompok dengan metode rancangan acak lengkap dilakukan agar setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapat kesempatan sebagai sampel baik dalam kelompok penelitian maupun dalam kelompok kontrol.

4.7.2 Proses Pemeliharaan Hewan Coba

- a. Tikus ditempatkan pada sebuah kandang yang berupa *box* plastik berukuran 15 x 30 x 42 cm sebanyak 30 buah dan diisi dengan sekam, ditutup dengan kawat kasa dan di dalamnya diberi botol air. Masing-masing ditempatkan 1 ekor tikus.
- b. Sebelum perlakuan, berat badan tikus ditimbang, yaitu pada awal masa adaptasi untuk mengambil rata-rata berat badan tikus sehingga pemberian dosis dapat disamakan pada semua tikus dan akhir masa adaptasi sehingga dapat dipantau berat badan tikus.
- c. Pada saat perlakuan, pemberian pakan pada kelompok kontrol negatif adalah diet normal.

- d. Pemberian diet tinggi lemak diberikan sebagai pakan tikus. Pemberian MSG dilakukan melalui sonde lambung sesuai dengan takaran pada tiap kelompok. Hal ini dilakukan untuk menjaga dosis pemberian MSG pada tikus.
- e. Dilakukan penimbangan sisa pakan tikus tiap kelompok perlakuan setiap hari untuk mengetahui asupan makanan tikus.
- f. Perlakuan tikus dilakukan secara bersamaan selama 56 hari dan sekam diganti setiap 4 hari sekali.
- g. Selama 56 hari perlakuan, dilakukan pengecekan *swab vagina* untuk mengetahui pola siklus estrus dari semua tikus.
- h. Pada akhir penelitian setelah 56 hari, semua tikus ditimbang berat badannya.

4.7.3 Pemberian MSG Pada Hewan Coba

MSG *L-glutamic acid monosodium salt hydrate* 99% dicampurkan dengan *aquabides* 1 ml dengan dosis yang sesuai dengan kelompok perlakuan. MSG diberikan ke tikus dengan cara disonde.

Pemberian MSG diberikan pada kelompok kontrol (+) 2, dan kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3). Dosis MSG yang diberikan mengacu pada penelitian Megawati, dkk. (2005) dimana kelompok perlakuan diberikan MSG dengan dosis 77 mg, 98 mg, 119 mg, dan 140 mg/200gBB tikus. Pemberian dosis MSG 140mg/200gBB tikus menunjukkan bahwa pola fase diestrus yang relatif lebih singkat dan fase proestrus serta estrus relatif memanjang dibandingkan dengan kelompok kontrol. Oleh karena itu, pada penelitian ini menggunakan dosis MSG yaitu 0,7 mg/gBB tikus pada kelompok kontrol (+) 2 karena sudah terbukti dosis tersebut memberikan efek ke siklus estrus secara signifikan.

Peneliti melakukan penurunan dosis pada kelompok percobaan mendekati dosis yang dikonsumsi oleh manusia. *Intake* harian rata-rata MSG pada manusia yaitu 550 mg/hari (J. Mustafa *et al.*, 2015). Jika dikonversikan ke dosis tikus (200 g) maka $550 \times 0,018$ (Tabel. 4.4) = 9,9 mg/200g BB tikus = 0,0495 mg/gBB (dibulatkan menjadi 0,05) mg/gBB. Peneliti menggunakan dosis pertama 0,05 mg/gBB dan pemberian dosis kedua dan ketiga menggunakan interval 1,5 yaitu 0,2 mg/gBB dan 0,35 mg/gBB. MSG dicampurkan ke dalam aquades 1 ml dengan dosis yang sesuai dengan kelompok perlakuan. MSG diberikan secara oral dengan menggunakan sonde.

Tabel 4.1 Konversi Perhitungan Dosis dari Manusia Terhadap Tikus

	Mencit (20 g)	Tikus (200 g)	Marmot (400 g)	Kelinci (1,5 kg)	Kera (4 kg)	Anjing (12 kg)	Manusia (70 kg)
Mencit (20 g)	1,0	7,0	12,25	27,8	64,1	124,2	387,9
Tikus (200 g)	0,14	1,0	1,74	3,9	9,2	17,8	56,0
Marmot (400 g)	0,08	0,57	1,0	2,25	5,2	10,2	31,5
Kelinci (1,5 kg)	0,04	0,25	0,44	1,0	2,4	4,5	14,2
Kera (4 kg)	0,016	0,11	0,19	0,42	1,0	1,9	6,1
Anjing (12 kg)	0,008	0,06	0,10	0,22	0,52	1,0	3,1
Manusia (70 kg)	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,16	0,32	1,0

Sumber: (Donatus, 1996)

4.7.4 Pembuatan Diet Tinggi Lemak

Pembuatan diet tinggi lemak untuk 2,5 kg pakan dengan komposisi sebagai berikut: tepung jagung 550 gram, gula pasir 457,5 gram, korsvet 275 gram, margarin 275 gram, *soybean oil* 130 gram, gelatin 130 gram, kasein 335

gram, CMC 132,5 gram, vitamin dan mineral 25 butir, air 375 gram dan asam kolat 5 gram (Reeves, 1997; Handayani, 2012).

Cara pembuatannya, pertama, tepung jagung dicampur dengan kasein, gula pasir yang telah diblender, vitamin, CMC dan asam kolat. Lalu panaskan margarin, korsvet, *soybean oil* hingga tercampur. Setelah tercampur, tuangkan campuran margarin, korsvet dan *soybean oil* pada campuran tepung. Aduk hingga rata. Kemudian panaskan air dan gelatin hingga mendidih di atas kompor dengan api kecil sambil diaduk. Lalu campuran air dan gelatin tadi dimasukkan ke dalam campuran tepung dan minyak dan diaduk hingga kalis. Setelah adonan kalis, bentuk pakan berbentuk bulat kemudian ditimbang sesuai dengan konsumsi tikus pakan basah yaitu 15% dari BB tikus, pakan tikus diberikan 25 gram/tikus/hari.

4.7.5 Pembuatan Diet Normal

Pakan normal yang diberikan pada saat aklimatisasi memiliki komposisi (untuk 1 kg pakan): tepung jagung 615 gram, gula pasir 85 gram, *soybean oil* 45 gram, gelatin 65 gram, kasein 90 gram, CMC 51 gram, vitamin dan mineral 5 butir. (Reeves, 1997; Handayani, 2012).

Bahan yang disiapkan dan ditimbang sesuai dengan komposisi dan jumlah kemudian dicampur. Kemudian panaskan air dan gelatin hingga mendidih di atas kompor dengan api kecil sambil diaduk. Lalu campuran air dan gelatin tadi dimasukkan ke dalam campuran tepung dan minyak dan diaduk hingga kalis. Setelah adonan kalis, bentuk pakan berbentuk bulat kemudian ditimbang sesuai dengan konsumsi tikus pakan basah yaitu 15% dari BB tikus, pakan tikus diberikan 25 gram/tikus/hari.

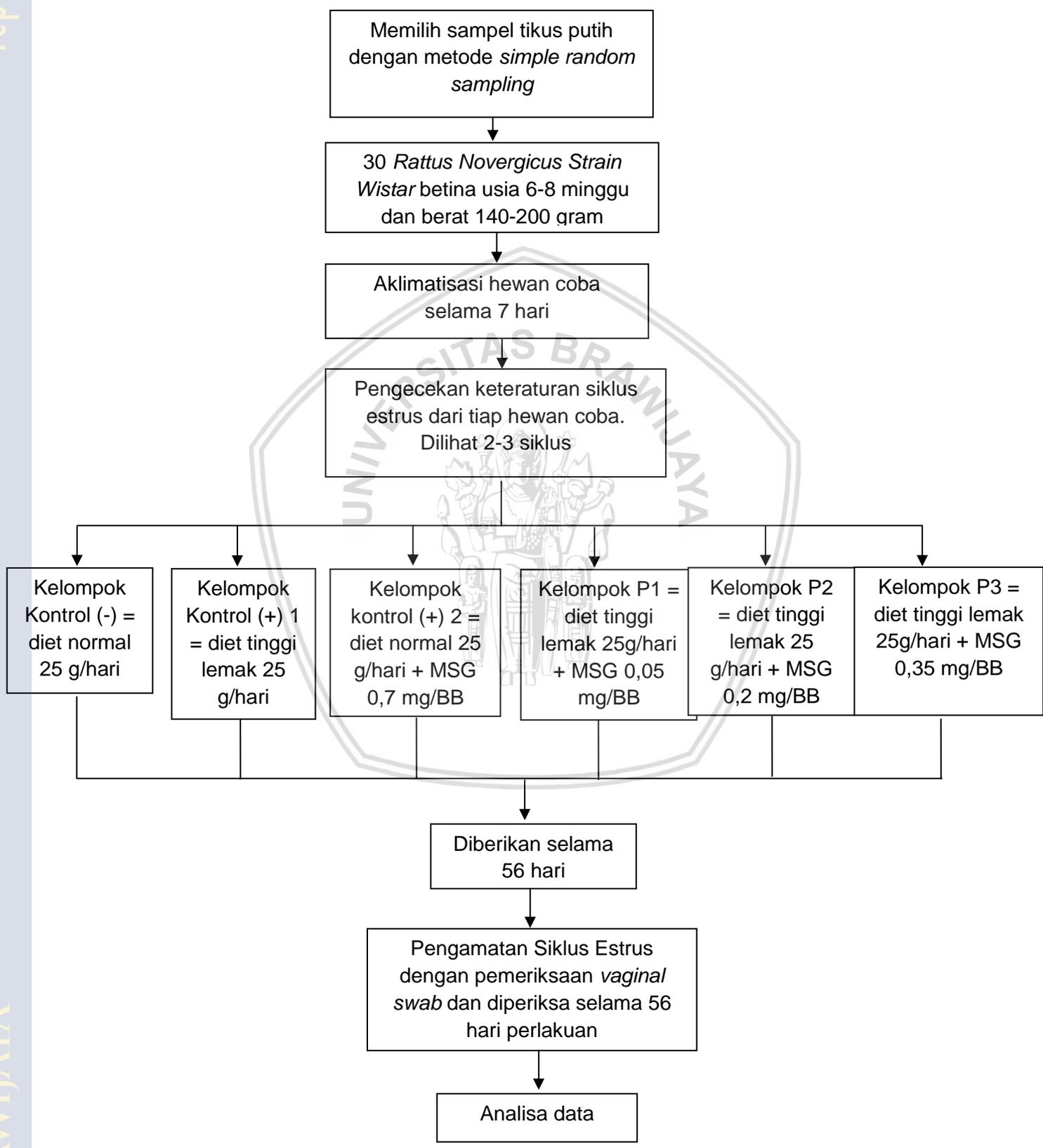
4.7.6 Prosedur Pengerjaan Preparat Sitologi

Siklus estrus diperiksa dengan metode *vaginal swab*, caranya yaitu *cotton bud* dicelupkan ke dalam NaCl 0,9%, kemudian ujungnya dimasukkan ke dalam lubang vagina tikus dengan sudut 45° dan melakukan pengusapan sebanyak 1 – 2 kali putaran. Ujung *cotton bud* kemudian dioleskan pada *object glass*, dibuat hapusan tipis dan merata lalu dikeringkan. Setelah preparat kering, preparat difiksasi menggunakan alkohol absolut selama 3-5 menit kemudian keringkan. Selanjutnya preparat ditetesi larutan giemsa selama 5-10 menit kemudian tuang larutan giemsa di preparat ke tisu lalu cuci dengan air mengalir dan keringkan. Preparat lalu diamati morfologi sel epitel di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x lalu dicatat (Prayogha, 2012).

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan Uji *One Way ANOVA* untuk data yang berdistribusi normal.

4.9 Skema Alur Penelitian

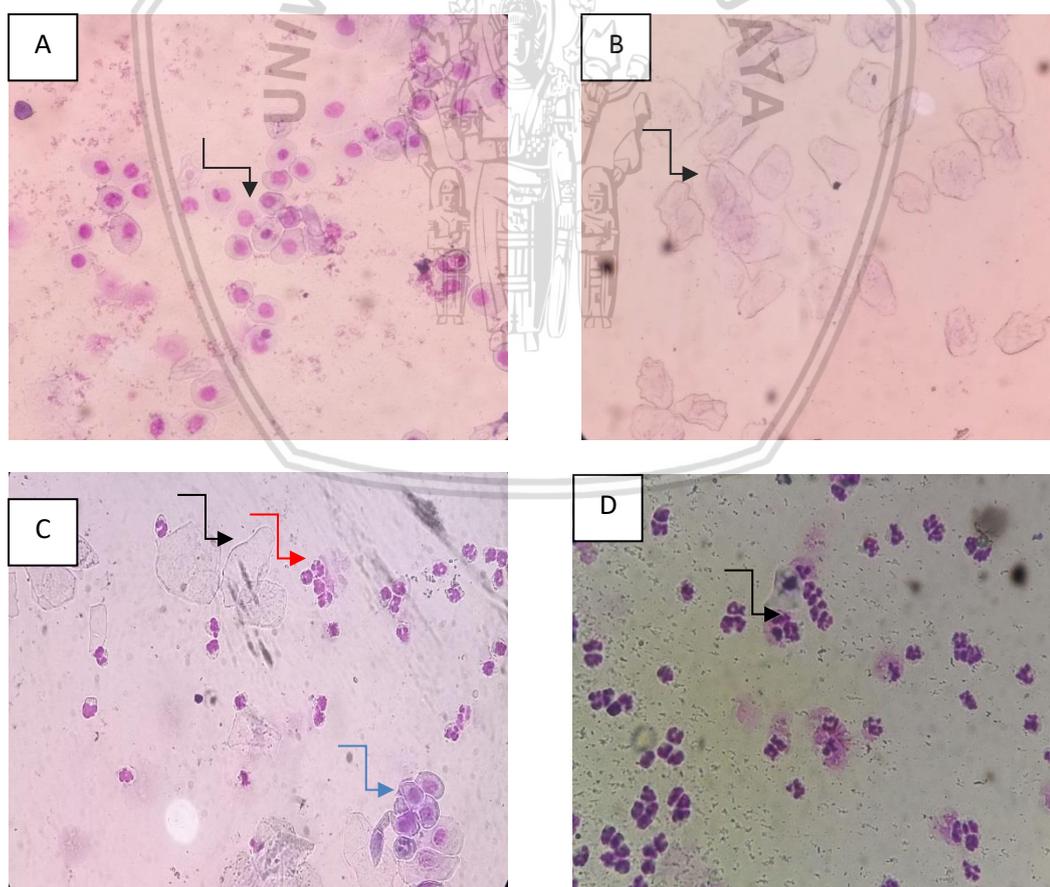


BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Analisis Jumlah Siklus Estrus

Fase siklus estrus pada setiap sampel ditentukan dengan cara vaginal swab. Vaginal swab dilakukan selama perlakuan yaitu 56 hari. Selanjutnya preparat hasil vaginal swab diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x dan ditentukan fase siklus estrus berdasarkan sel-sel yang teramati di preparat setiap harinya. Kemudian dihitung jumlah siklus estrus selama 56 hari perlakuan.

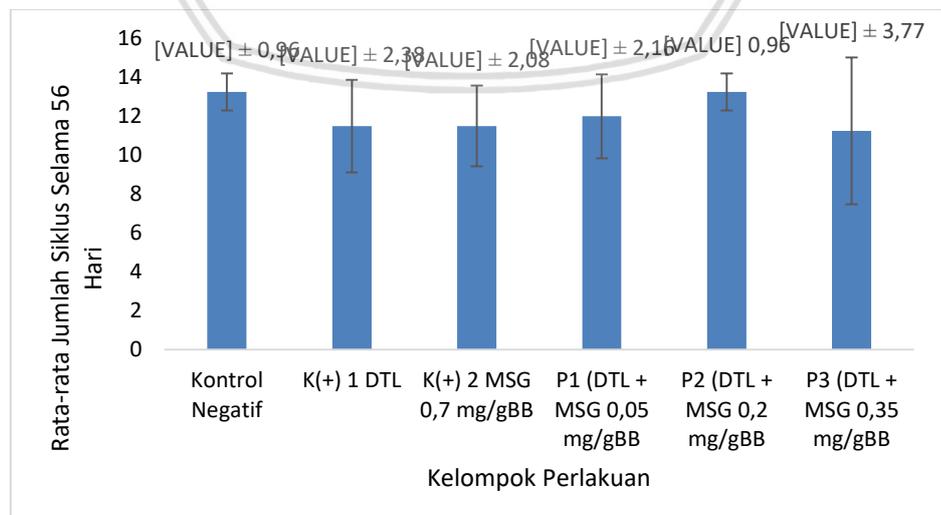


Gambar 5.1 Gambaran Pada Preparat Apusan Vagina Tikus dengan Pewarnaan Giemsa dan Perbesaran Mikroskop 40x

Gambar (a) adalah gambar preparat fase proestrus yang didominasi oleh sel epitel berinti (panah hitam). Gambar (b) adalah gambar preparat fase estrus yang didominasi oleh sel epitel tidak berinti (panah hitam). Gambar (c) adalah gambar preparat fase metestrus yang ditandai adanya sel epitel berinti (panah biru), sel epitel tidak berinti (panah hitam) dan sel leukosit (panah merah). Gambar (d) adalah gambar preparat fase diestrus yang didominasi dengan sel leukosit (panah hitam).

Setelah mendapatkan hasil penelitian, maka dilanjutkan dengan analisis data dengan *SPSS 16.0 for windows*. Analisis data yang dilakukan berdasarkan jumlah siklus yang terjadi selama penelitian yaitu 56 hari. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji statistik *Levene*. Hasil dari uji normalitas menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$. Uji homogenitas menunjukkan bahwa data penelitian bersifat homogen dengan $p = 0,254 > 0,05$.

Dikarenakan data normal dan homogen, maka dapat dilanjutkan ke analisa *bivariat* dengan menggunakan uji parametrik *One Way ANOVA*. Berdasarkan uji parametrik *One Way ANOVA* didapatkan nilai $p = 0,673$ yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara jumlah siklus estrus pada setiap kelompok penelitian. Kemudian dilanjutkan dengan *post hoc test* dengan menggunakan uji Tukey HSD. Hasil pengujian Tukey HSD dapat dilihat pada tabel 5.1.



Gambar 5.2 Perbandingan Rata-Rata Jumlah Siklus Estrus Yang Terjadi Selama 56 Hari Perlakuan



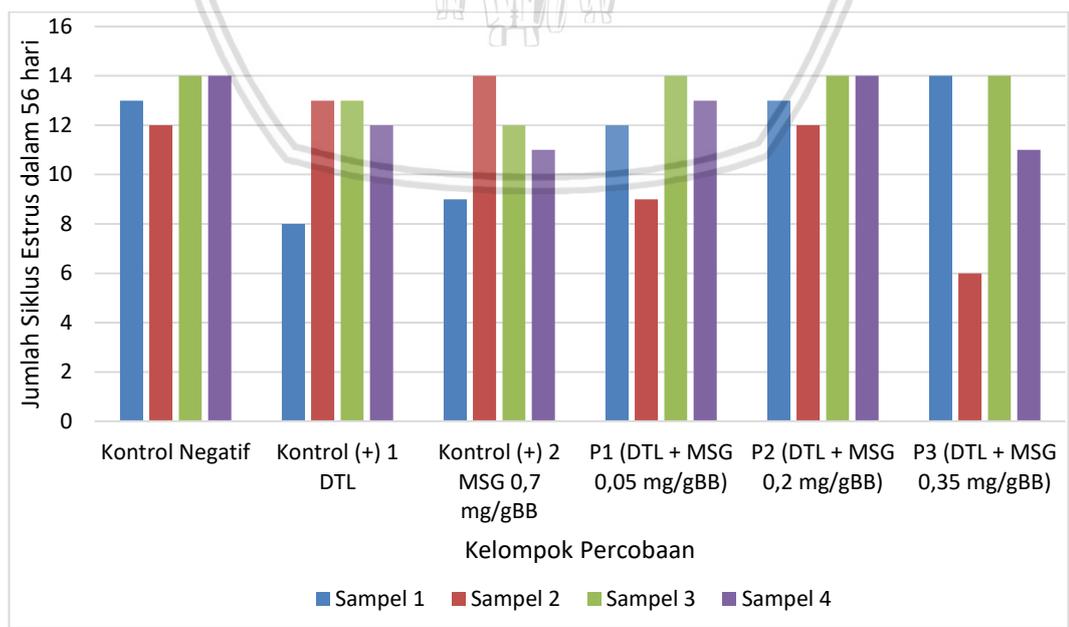
Tabel 5.1 Uji Tukey HSD rata-rata jumlah siklus estrus yang terjadi selama 56 hari

<i>p-value</i>	K(+1)	K(+2)	P1	P2	P3
K(-)	0.878	0.878	0.967	1.000	0.807
K(+1)		1.000	1.000	0.878	1.000
K(+2)			1.000	0.878	1.000
P1				0.967	0.997
P2					0.807

p-value<0,05 adalah bermakna.

K (-) adalah tikus yang tidak mendapatkan perlakuan, K (+) 1 adalah tikus yang diberikan DTL 25 gr/hari; K (+) 2 adalah tikus yang diberikan MSG 0,7 mg/gBB; P1 adalah tikus yang diberikan DTL+MSG 0,05 mg/gBB; P2 adalah tikus yang diberikan DTL+MSG 0,2 mg/gBB; dan P3 adalah tikus yang diberikan DTL+MSG 0,35 mg/gBB.

Berdasarkan uji lanjutan Post Hoc yaitu pada tabel 5.1 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan jika dibandingkan satu kelompok perlakuan dengan kelompok perlakuan yang lain.



Gambar 5.3 Jumlah Siklus Estrus Selama 56 Hari Pada Tiap Sampel di Kelompok Perlakuan



Rentang jumlah siklus normal selama 56 hari antara 12-14 siklus jika berdasarkan durasi normal satu siklus estrus yaitu 4-5 hari

Gambar 5.3 menunjukkan jumlah siklus estrus selama perlakuan pada setiap sampel di tiap kelompok. Pada kelompok kontrol negatif, semua tikus mempunyai jumlah siklus estrus yang normal yang menandakan semua sampel mempunyai siklus estrus yang reguler.

Dari kelompok kontrol positif 1 yang diberikan DTL saja menunjukkan hanya 1 tikus yang mempunyai siklus estrus yang ireguler dengan jumlah siklus berjumlah 8 siklus. Sedangkan kelompok kontrol positif 2 yang diberikan pakan normal dan MSG 0,7 mg/gBB menunjukkan 2 sampel yang mempunyai siklus estrus ireguler dengan jumlah siklus yaitu 9 dan 11 siklus.

Pada kelompok perlakuan, kelompok P1 yang diberikan DTL dan MSG 0,05 mg/gBB terlihat bahwa 1 sampel mempunyai siklus estrus ireguler dengan jumlah siklus 9 siklus. Pada kelompok P2 yang diberikan DTL dan MSG 0,2 mg/gBB, semua sampel mempunyai jumlah siklus estrus yang reguler dengan jumlah siklus yang sama dengan kelompok kontrol negatif. Sedangkan pada kelompok P2 yang diberikan DTL dan MSG 0,35 mg/gBB terdapat 2 sampel yang mempunyai siklus estrus ireguler dengan jumlah siklus yaitu 6 dan 11 siklus.

5.2 Analisis Durasi Tiap Fase Siklus Estrus

Tabel 5.2 Durasi Tiap Fase Siklus Estrus (hari)

Fase	Rata-rata K(-)	K(+) ¹ DTL	K(+) ² MSG 0,7 mg/gBB		Kelompok Perlakuan			Ket.
					KP 1 (DTL + MSG 0,05 mg/gBB)	KP 3 (DTL + MSG 0,35 mg/gBB)		
Proestrus	10,25	7	7	9	5	9	5	Memendek
Estrus	15	9	15	19	10	12	6	Memanjang di K(+) ²
Metestrus	13,25	12	12	11	17	12	9	Memanjang di KP 1
Diestrus	17,5	28	22	17	24	23	32	Memanjang

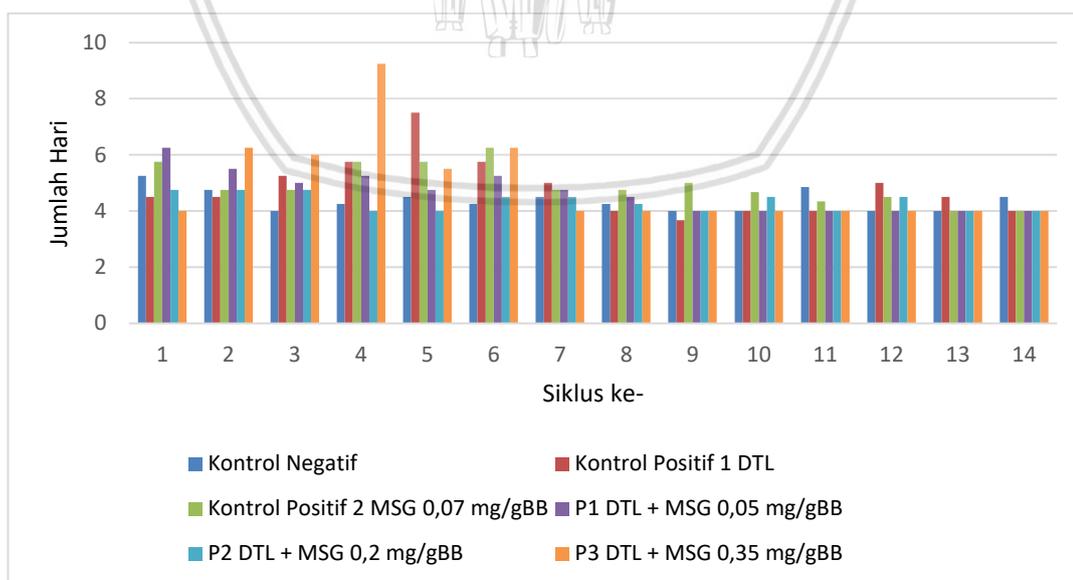
Pada tabel 5.2 tersebut, data diambil dari 1 sampel dari kelompok kontrol negatif yang mempunyai siklus estrus reguler sebagai perbandingan dan 6 sampel dari kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan kombinasi MSG dan DTL yang mempunyai siklus estrus ireguler. Terlihat dari tabel tersebut bahwa fase proestrus mengalami penurunan durasi pada kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1 (DTL + MSG 0,05 mg/gBB) dan kelompok perlakuan 1 (DTL + MSG 0,35 mg/gBB) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Pada fase diestrus juga menunjukkan peningkatan durasi pada kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1 (DTL + MSG 0,05 mg/gBB) dan kelompok perlakuan 1 (DTL + MSG 0,35 mg/gBB) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Fase estrus hanya menunjukkan peningkatan di kelompok kontrol positif 2 (MSG 0,7 mg/gBB) dan fase metestrus hanya menunjukkan peningkatan di kelompok perlakuan 1 (DTL + MSG 0,35 mg/gBB).

5. 3 Analisis Jumlah Hari Tiap Fase Siklus Estrus

Tabel 5.3 Rata-rata jumlah hari tiap fase siklus estrus

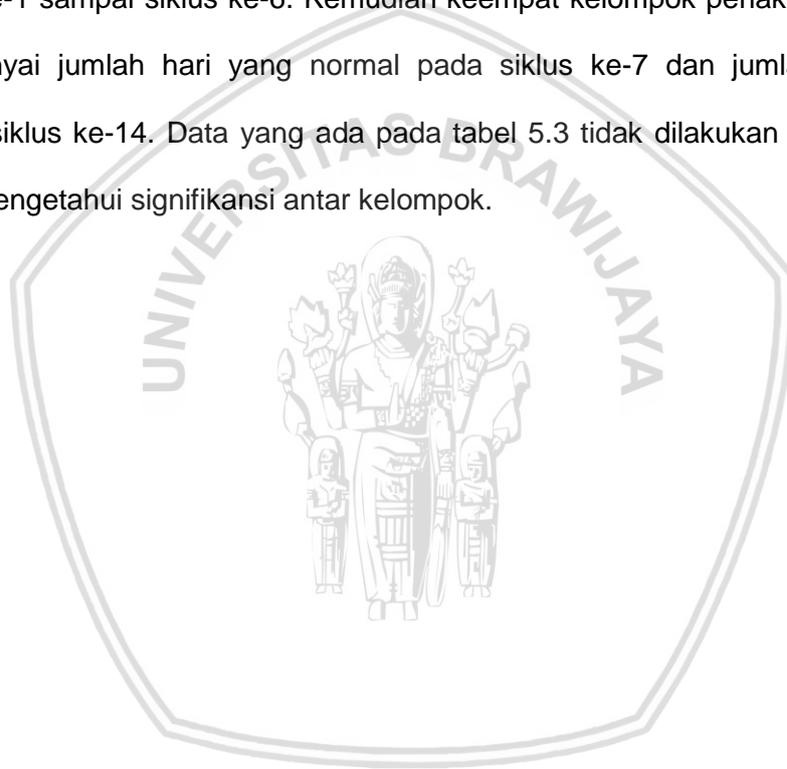
Siklus ke-	Kontrol (-)	Kontrol (+) 1 DTL	Kontrol (+) 2 MSG 0,07 mg/gBB	P1 (DTL + MSG 0,05 mg/gBB)	P2 (DTL + MSG 0,2 mg/gBB)	P3 (DTL + MSG 0,35 mg/gBB)
1	5,25*	4,5	5,75*	6,25*	4,75	4
2	4,75	4,5	4,75	5,5*	4,75	6,25*
3	4	5,25*	4,75	5	4,75	6*
4	4,25	5,75*	5,75*	5,25*	4	9,25*
5	4,5	7,5*	5,75*	4,75	4	5,5*
6	4,25	5,75*	6,25*	5,25*	4,5	6,25*
7	4,5	5	4,75	4,75	4,5	4
8	4,25	4	4,75	4,5	4,25	4
9	4	3,67	5	4	4	4
10	4	4	4,67	4	4,5	4
11	4,85	4	4,34	4	4	4
12	4	5	4,5	4	4,5	4
13	4	4,5	4	4	4	4
14	4,5	4	4	4	4	4

Durasi satu siklus estrus yang normal adalah 4-5 hari. Tanda (*) menunjukkan siklus estrus yang memanjang.



Gambar 5.4 Rata-rata Jumlah hari tiap fase siklus estrus

Pada tabel 5.3 dan gambar 5.4 menunjukkan rata-rata jumlah hari yang terjadi pada tiap siklus. Pada kelompok kontrol negatif dan kelompok P2 (DTL + MSG 0,2 mg/gBB), jumlah hari dalam tiap siklusnya tergolong stabil hingga akhir perlakuan. Sedangkan pada kelompok kontrol positif 1 (DTL), kelompok kontrol positif 2 (MSG 0,7 mg/gBB), kelompok P1 (DTL + MSG 0,05 mg/gBB), kelompok P3 (DTL + MSG 0,35 mg/gBB) terlihat pemanjangan siklus estrus pada pada siklus ke-1 sampai siklus ke-6. Kemudian keempat kelompok perlakuan tersebut mempunyai jumlah hari yang normal pada siklus ke-7 dan jumlahnya stabil hingga siklus ke-14. Data yang ada pada tabel 5.3 tidak dilakukan analisa data untuk mengetahui signifikansi antar kelompok.



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan

Berdasarkan hasil dari penelitian yang telah dilakukan, tidak terdapat perbedaan yang signifikan jumlah siklus estrus selama 56 hari antara kelompok perlakuan kombinasi MSG dan DTL dengan kelompok kontrol positif maupun kelompok negatif ($p = 0,673$). Rata-rata sejumlah 25-50% sampel dari semua kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan kombinasi MSG dan DTL menunjukkan pemanjangan siklus estrus. Pemanjangan siklus estrus dapat terjadi hingga akhir perlakuan atau dapat menjadi reguler kembali pada minggu-minggu terakhir perlakuan.

Pada kelompok kontrol positif 1 dimana sampel diberikan pakan DTL, 25% sampel menunjukkan pemanjangan siklus estrus yang ditandai dengan pemanjangan fase diestrus. Sampel tersebut menunjukkan pemanjangan fase diestrus yang terjadi selama 11 hari. Hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Chakraborty T.R., *et al.*, (2016), dimana hasilnya adalah menunjukkan pemanjangan fase diestrus pada sampel yang diberi pakan DTL selama 25-27 minggu. Untuk fase proestrus, fase estrus dan fase metestrus, durasinya memendek jika dibandingkan kelompok kontrol negatif.

Pada kelompok kontrol positif 2 dimana sampel diberikan MSG 0,7 mg/g BB didapatkan 50% sampel mempunyai siklus estrus ireguler yang ditandai dengan pemanjangan durasi fase estrus dan diestrus jika dibandingkan dengan

kelompok kontrol negatif. Pemanjangan fase estrus yang ditemukan sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Megawati (2005) dengan pemberian MSG dosis 140 mg/ 200g BB dimana hasil penelitiannya menunjukkan pemanjangan fase estrus. Namun terdapat hasil penelitian yang berbeda dari dua penelitian sebelumnya yaitu pada penelitian Megawati (2005) dengan dan Nayanatara *et al.*, (2009) dimana tikus diberi MSG 4 gr/kgBB. Kedua penelitian tersebut menyebutkan bahwa terjadi pemanjangan fase proestrus dan pemendekan fase diestrus, tetapi penelitian ini menunjukkan fase proestrus yang tidak memanjang jika dibandingkan dengan kontrol negatif dan terdapat pemanjangan fase diestrus walaupun hanya 25% dari sampel.

Pada kelompok perlakuan 1 (DTL + MSG 0,05 mg/ grBB), siklus estrus pada sampel kelompok ini lebih menunjukkan efek DTL dengan adanya pemanjangan fase diestrus. Hal ini kemungkinan akibat dosis MSG yang terlalu kecil untuk memberikan efek pada hipotalamus yang dapat membuat ketidakseimbangan hormon reproduksi. Hal tersebut sesuai dengan penelitian dari Ibegbulem *et al.*, (2016) yang menyebutkan bahwa tidak ada peningkatan konsentrasi estrogen dan testosterone pada tikus yang diberi MSG sebesar 0,05 gram selama 90 hari.

Sejumlah 25-50% sampel dari kelompok kontrol positif maupun kelompok kontrol perlakuan kombinasi MSG dan DTL mengalami siklus estrus ireguler yang teramati pada siklus ke-1 hingga siklus ke-6 dan teramati siklus estrus reguler kembali pada siklus ke-7 hingga siklus ke-14. Temuan ini diduga karena tubuh tikus melakukan proses adaptasi terhadap paparan sehingga pada minggu-minggu terakhir perlakuan sehingga siklus estrus tikus menjadi reguler kembali. Hal tersebut disebutkan juga oleh Nayanatara *et al.*, (2009) dimana

pada penelitiannya terjadi perubahan siklus estrus pada tiga minggu pertama perlakuan dan menjadi reguler kembali pada minggu keempat perlakuan. Mekanisme adaptasi ini diduga akibat peningkatan inhibisi dari interneuron dan terjadi *over-replenished* glutamat pada dendrit neuron (Zhao *et al.*, 2017).

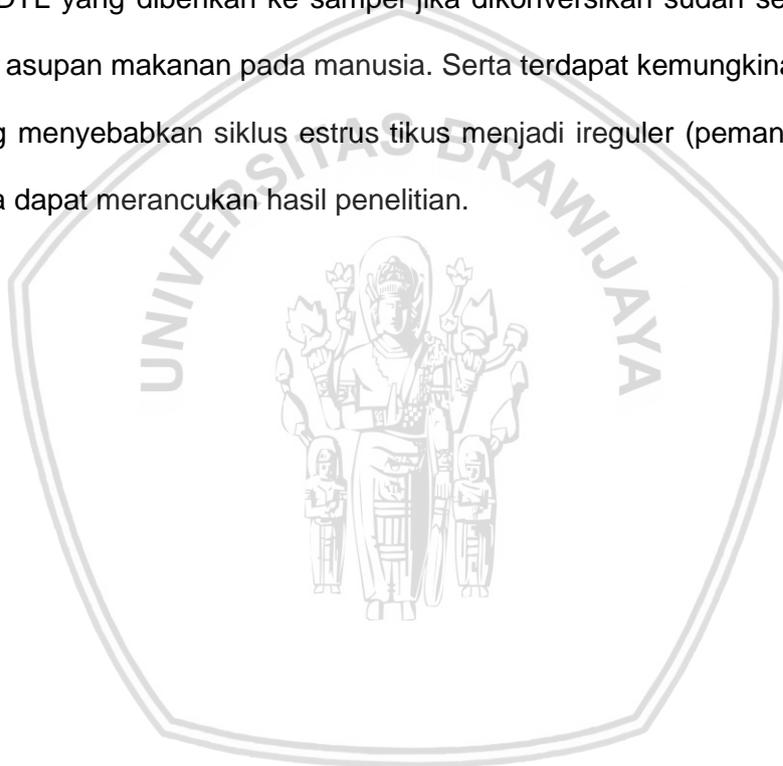
Diet tinggi lemak menyebabkan peningkatan lemak pada tubuh sehingga berpotensi menimbulkan *insulin resistance*. Keadaan tersebut dapat memicu penurunan konsentrasi SHBG dalam tubuh. Konsentrasi SHBG yang rendah menyebabkan peningkatan penyaluran androgen bebas pada target jaringan. Selain itu, *insulin resistance* juga menstimulasi steroidogenesis, produksi androgen berlebih dari sel teka dan produksi estrogen berlebih dari sel granulosa di ovarium (Ogbuji, 2010). Hal ini yang dapat menimbulkan ketidakseimbangan hormon di dalam tubuh yang dapat memicu siklus reproduksi yang tidak teratur. MSG juga dapat meningkatkan kadar estrogen dengan cara mengaktifasi enzim aromatase yang mengkatalisasi konversi testosterone menjadi estradiol sehingga terjadi peningkatan sintesis estrogen. Selain mempengaruhi kadar estrogen, MSG dapat meningkatkan kadar progesteron dengan cara meningkatkan kadar hormon LH (Zia *et al.*, 2014).

Pada kelompok perlakuan kombinasi MSG dan diet tinggi lemak menunjukkan peningkatan durasi diestrus. Pada fase estrus, metestrus dan diestrus, kadar hormon FSH dan LH rendah. Fase diestrus didominasi oleh hormon progesteron dan hormon estrogen mulai meningkat pada fase ini (Caligioni, 2009). Pada fase metestrus dan diestrus, sekresi progesteron meningkat (Marcondes *et al.*, 2002). Akibat pengaruh MSG dan diet tinggi lemak yang membuat peningkatan hormon estrogen dan progesteron membuat fase diestrus lebih lama karena kadar hormon estrogen dan progesteron yang tinggi

menghambat dimulainya pematangan folikel baru sehingga fase proestrus lebih jarang ditemui karena fase diestrus yang memanjang. Fase proestrus yang jarang ditemui kemungkinan akibat *swab vagina* yang hanya dilakukan pada pagi atau siang hari sehingga jika terdapat tikus yang mengalami fase proestrus pada malam hari, hal tersebut tidak sempat teramati karena bisa jadi fasenya sudah berganti menjadi fase estrus pada pagi harinya.

Kombinasi MSG dan Diet Tinggi Lemak pada dasarnya dapat mempengaruhi siklus estrus karena pada penelitian sebelumnya dimana efek MSG dan diet tinggi lemak terhadap siklus estrus yang diteliti secara terpisah sama-sama menyebutkan bahwa MSG dan Diet Tinggi Lemak dapat mempengaruhi keteraturan siklus estrus. Namun terdapat tikus yang tidak terpengaruh efek perlakuan pada penelitian ini diduga akibat tikus tersebut mengalami *diet-resistant* terhadap diet tinggi lemak yang diberikan. Hal ini sesuai dengan temuan pada penelitian Lie *et al.*, (2013) dimana terdapat tikus Sprague-Dawley yang mudah untuk diinduksi menjadi obesitas, sedangkan terdapat tikus yang *diet-resistant* terhadap perlakuan. Penyebab lainnya yaitu efek MSG dengan dosis kecil yang pengaruhnya tidak terlalu besar sehingga tidak sampai mengganggu keseimbangan glutamat di otak yang dapat mengakibatkan gangguan hormonal oleh hipotalamus. Hal ini sesuai dengan penelitian Ibegbulem *et al.*, (2016) yang menyebutkan pemberian MSG dosis rendah tidak menyebabkan efek samping yang parah terhadap tikus. Hussain, *et al.*, (2016) juga menyebutkan bahwa pemberian diet tinggi lemak pada tikus selama 13 minggu tidak mengakibatkan perubahan kadar hormon FSH, LH, estradiol dan progesteron yang signifikan dan dapat membuat siklus estrus tidak mengalami gangguan.

Keterbatasan dari penelitian ini antara lain *vaginal swab* yang hanya dilakukan satu kali dalam sehari sehingga tidak bisa mengetahui durasi tiap fase secara tepat dan terdapat fase yang terlewat untuk diamati. Lalu jumlah sampel yang sedikit dapat menjadi penyebab hasil yang tidak signifikan. Kemudian terdapat pemberian MSG yang terlewat beberapa kali selama penelitian yang dapat menurunkan efek MSG pada sampel. Selain itu belum diketahui dengan pasti apakah DTL yang diberikan ke sampel jika dikonversikan sudah sesuai dengan rata-rata asupan makanan pada manusia. Serta terdapat kemungkinan penyebab lain yang menyebabkan siklus estrus tikus menjadi ireguler (pemanjangan fase) sehingga dapat merancukan hasil penelitian.



BAB 7

KESIMPULAN

7.1 Kesimpulan

- 7.1.1 Pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG berbagai dosis tidak berpengaruh ke siklus estrus tikus.
- 7.1.2 Pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG menyebabkan 25-50% sampel memiliki siklus estrus ireguler yang muncul pada siklus ke-1 hingga siklus ke-6 dan kembali reguler pada siklus ke-7 sampai siklus ke-14.
- 7.1.3 Pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG dengan penambahan dosis tidak membuat siklus estrus tikus menjadi semakin ireguler.

7.2 Saran

- 7.2.1 Untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan vaginal swab 2 kali dalam sehari untuk mengetahui durasi tiap fase secara tepat.
- 7.2.2 Untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan dengan perbedaan lama paparan dan usia tikus terhadap kombinasi diet tinggi lemak dan MSG.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif Yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*. Adabia Press. Jakarta, hal. 1-47.
- Alalwani, Aisha D. 2014. Monosodium Glutamate Induced Testicular Lesions in Rats (Histological Study). *Middle East Fertility Society Journal*. 19: 274–280.
- Appaiah, K.M. 2010. Monosodium Glutamate in Foods and Its Biological Effects in Boisrobert, C., Oh, S., Stjepanovic, A., Lelieveld, H. (Eds.), *Ensuring Global Food Safety*. Academic Press. USA, 217-226.
- Ataseven, Nazmiye *et al.* 2016. Genotoxicity of Monosodium Glutamate. *Food and Chemical Toxicology*. 91: 8-18.
- Balasubramanian, Priya, *et al.* 2012. High Fat Diet Affects Reproductive Functions in Female Diet Induced Obese and Dietary Resistant Rats. *Journal of Neuroendocrinol*. 24(5): 748–755.
- Boozer C.N, Schoenbach G. & Atkinson R.L. 1995. Dietary Fat and Adiposity – A Dose–Response Relationship in Adult Male Rats Fed Isocalorically. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 268: 546–550.
- Buettner R., Scholmerich J. & Bollheimer LC. 2007. High Fat Diets: Modeling The Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 15: 798-808.
- Byers, Shannon L., *et al.* 2012. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS ONE*. 7(4): 1-5.
- Caligioni, Claudia. 2010. Assessing Reproductive Status/ Stages in Mice. *Curr Protoc Neurosci*. 4: 1-11.
- Cerf, M.E. 2007. High Fat Diet Modulation of Glucose Sensing in The Beta-Cell. *Med Sci Monit*. 13(1): 12–17.

- Chakraborty T.R., *et al.* 2016. Long-Term High Fat Diet Has a Profound Effect on Body Weight, Hormone Levels, and Estrous Cycle in Mice. *Med Sci Monit.* 22: 1601-1608.
- Collison, Kate S., *et al.* 2010. Dietary Trans-Fat Combined with Monosodium Glutamate Induces Dyslipidemia and Impairs Spatial Memory. *Physiology & Behavior.* 99: 334–342.
- Dağ, Zeynep Özcan & Berna Dilbaz. 2015. Impact of Obesity on Infertility in Women. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 16: 111-117.
- Davis J.B. & Segars J.H. 2009. Menstruation and Menstrual Disorders: Anovulation. *Glob Libr Women's Med.* <http://www.glowm.com/>
- Ebaid, H.M., Tag, M.H. 2012. Monosodium Glutamate Toxic Effect on Spleen Structure and Potentiality of Recovery in Adult Albino Rats. *Egypt Academy Journal Biology Science.* 4(1): 1-8.
- Esminger, A.H., M.E. Esminger, J.E. Konlande & J.R.K. Robson. 1995. *The Concise Encyclopedia of Foods and Nutrition.* New York: CRC Press.
- Eweka, A. O. & Om'iniabohs, F. A. E. 2011. Histological Studies of the Effects of Monosodium Glutamate on the Ovaries of Adult Wistar Rats. *Annal of Medical & Health Sciences Research.* 1(1): 37-43.
- Geha R.S, *et al.* 2000. Review of Alleged Reaction to Monosodium Glutamate and Outcome of a Multicenter Double- Blind Placebo-Controlled Study. *Journal of Nutrition.* 130(4): 1058-1062.
- Ghibaudi L., Cook J., Farley C., *et al.* 2002. Fat Intake Affects Adiposity, Comorbidity Factors and Energy Metabolism of Sprague-Dawley Rats. *Obes Res.* 10: 956–963.
- Gill, S.S., *et al.* 2000. Potential Target Sites in Peripheral Tissues for Excitatory Neurotransmission and Excitotoxicity. *Toxicol Pathol.* 28 (2): 277-284.
- Goldman, Jerome M., *et al.* 2007. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Research (Part B).* 80: 84–97.

- Guyton, Arthur C. 2006. *Textbook of Medical Physiology*, 11th ed. Elsevier Inc: USA, 1020-1021.
- Hairi, Niloofar & Louise Thibault. 2010. High-Fat Diet-Induced Obesity in Animal Models. *Nutrition Research Reviews*. 23: 270-299.
- Handayani, D. 2012. *Prevention and Treatment of High Fat-Diet-Induced by Dietary Intake of Shiitake and Oat*. Thesis. Health and Behavioural Faculty. Wollongong University, Australia.
- He, K., Du S., *et al.* 2011. Consumption of Monosodium Glutamate in Relation to Incidence of Overweight in Chinese Adults: China Health and Nutrition Survey (CHNS). *The American Journal of Clinical Nutrition*. 93(6):13-28.
- Hussain, Mona A., *et al.* 2016. Effect of Feeding A High-Fat Diet Independently of Caloric Intake on Reproductive Function in Diet-Induced Obese Female Rats. *Arch Med*. 12(4): 906–914
- Ibegbulem, Chiedozie Onyejiaka, *et al.* 2016. Effects of Diet Containing Monosodium Glutamate on Organ Weights, Acute Blood Steroidal Sex, Hormone Levels, Lipid Profile and Erythrocyte Antioxidant Enzymes Activities of Rats. *Journal of Acute Disease*. 5(5): 402–407.
- Igwebuike, Udensi M., *et al.* 2011. The Effects of Oral Administration of Monosodium Glutamate (MSG) on The Testicular Morphology and Cauda Epididymal Sperm Reserves of Young and Adult Male Rats. *VETERIN. ARSKI ARHIV*. 81(4): 525-534.
- Jasik, C.B., Lustig R.H. 2008. Adolescent Obesity and Puberty: The “Perfect Storm”. *Ann NY Acad Sci*. 1135: 265–279.
- Jinap, S. & Hajeb P. 2010. Glutamate: Its Applications in Food and Contribution to Health. *Appetite*. 55: 1-10.
- Kieffer, T.J. & Habener J.F. 2000. The Adipoinular Axis: Effects of Leptin on Pancreatic Beta-Cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 278: 1–14.
- Lie, Maria E.K., *et al.* 2013. Effect of A Postnatal High-Fat Diet Exposure on Puberty Onset, Estrous Cycle Regularity and Kisspeptin Expression in Female Rats. *Reproductive Biology*. 13: 298–308.

- Marcondes, F. K., *et al.* 2002. Determination of The Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations. *Braz. J. Biol.*, 62(4A): 609-614.
- Marques, Claudia *et al.* 2016. High-Fat Diet-Induced Obesity Rat Model: A Comparison Between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte*. 5(1): 11-21
- Megawati, Dian Sutarno & Shanti Listyawati. 2005. Siklus Estrus dan Struktur Histologis Ovarium Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Setelah Pemberian Monosodium Glutamat (MSG) Secara Oral. *BioSMART*. 7(1): 47-52.
- Moussavi N., Gavino V. & Receveur O. 2008. Could The Quality of Dietary Fat, and Not Just Its Quantity, Be Related to Risk of Obesity?. *Obesity*. 16: 7–15.
- Mustafa, Snoor J., *et al.* 2015. Effect of Monosodium Glutamate on Mice ovaries and the Possible Protective Role of Vitamin C. *Annals of Applied Bio-Sciences*. 2(4): 100-105.
- Nayanatara, A.K., *et al.* 2009. Short Term and Long Term Effect of Monosodium Glutamate (Ajinomoto) on Ingestive Behavior and Estrous Cycle in Female Wistar Rats. *Research Gate*. 5(2): 19-22.
- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta, hal 51-53
- Nwajei, Joy Chukwuekwu, *et al.* 2015. Effects of Oral Administration of Selected Food Seasonings Consumed in Nigeria on Some Sex Hormones of Wistar Albino Rats. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry (IOSR-JBB)*. 1(5): 15-21.
- Ogbuji, Queen Chidinma. 2010. Obesity and Reproductive Performance in Women. *African Journal of Reproductive Health*. 14(3): 143-152.
- Oladipo, I.C., E. A. Adebayo and O. M. Kuye. 2015. Effects of Monosodium Glutamate in Ovaries of Female Sprague-Dawley Rats. *International Journal Curr Microbiol App Sci*. 4(5): 737-745.
- Partodiharjo S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Jakarta: Mutiara Sumber Widya, hal 35-36.

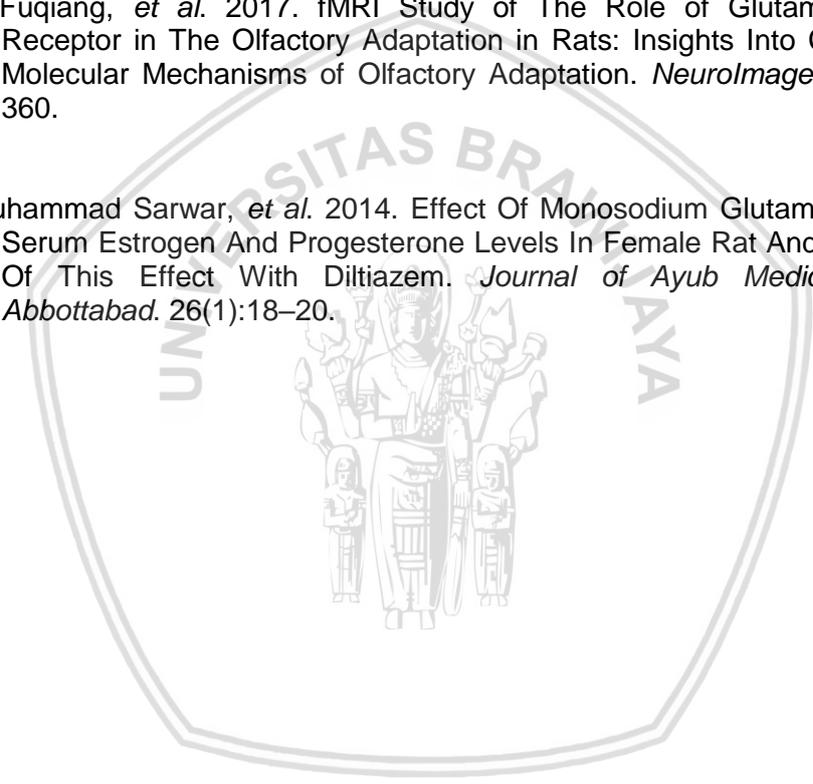
- Pasquali R., et al. 2003. Obesity and Reproductive Disorders in Women. *European Society of Human Reproduction and Embriology*. Diunduh dari <http://humrep.oxfordjournals.org/>
- Pavlovic, V., Pavlovic, D., Kocic, G., Sokolovic, D., Jevtovic-Stoimenov, T., Cekic, S., Velickovic, D. 2007. Effect of Monosodium Glutamate on Oxidative Stress and Apoptosis in Rat Thymus. *Mol Cell Biochem*. 303(12): 161-166.
- Prayogha, P. 2012. *Profil Hormon Ovari Sepanjang Siklus Estrus Tikus (Rattus norvergicus) Betina Menggunakan Fourier Transform Infrared (FTIR)*. Skripsi. Departemen Biologi Fakultas MIPA Universitas Indonesia.
- Reeves, P. G. 1997. Compound of the AIN-93 Diets as Improvement of AIN-76A Diets. *The Journal of Nutrition*. 127: 8385-8415.
- Septadina, Indri Seta. 2014. *Pengaruh Monosodium Glutamat terhadap Sistem Reproduksi: Seminar Bagian Anatomi*. Palembang: Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya.
- Sharma, Vivek & Rahul Desmukh. 2015. Ajinomoto (MSG): A Fifth Tatse or A Bio Bomb. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 2(2): 381-400.
- Sherwood, Lauralee. 2007. *Fisiologi Manusia: dari Sel ke Sistem, Ed. 6*. Brahm U. Pedit (penerjemah). 2011. Jakarta: EGC, hal. 837-843.
- Shreya, et al. 2011. Effect of Piperine in The Regulation of Obesity-Induced Dyslipidemia in High-Fat Diet Rats. *Indian Journal of Pharmacology*. 43(3): 296-299.
- Smith, J.B., dan S. Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta: Universitas Indonesia Press, hal 24-27.
- The Natural Health Place. "The Truth About MSG and Aspartame" Hilary. 31 March 2008 diunduh pada <http://www.hilary.com/features/msg.html>

Umami, Riza, *et al.* 2014. Pengaruh Vitamin C dan E terhadap Histologi Tuba Fallopii pada Tikus yang Dipapar MSG. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 28(2): 63-67.

Widiartini, W., E. Siswati, A. Setiyawati, I.M. Rohmah, Prasetyo E. 2013. *Pengembangan Usaha Produksi Tikus Putih (Rattus Novergicus) Tersertifikasi Dalam Upaya Memenuhi Kebutuhan Hewan Laboratorium.* Diunduh pada tanggal 10 Mei 2017 di <http://artikel.dikti.go.id/index.php/PKMK/article/download/149/150>

Zhao, Fuqiang, *et al.* 2017. fMRI Study of The Role of Glutamate NMDA Receptor in The Olfactory Adaptation in Rats: Insights Into Cellular and Molecular Mechanisms of Olfactory Adaptation. *NeuroImage*. 149: 348–360.

Zia, Muhammad Sarwar, *et al.* 2014. Effect Of Monosodium Glutamate On The Serum Estrogen And Progesterone Levels In Female Rat And Prevention Of This Effect With Diltiazem. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*. 26(1):18–20.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Laik Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA
 FAKULTAS KEDOKTERAN
 KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
 Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
 http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
 ("ETHICAL CLEARANCE")

No. 292 / EC / KEPK / 08 / 2017

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Pengaruh Kombinasi Monosodium Glutamat dan Diet Tinggi Lemak terhadap Berbagai Penanda Obesitas serta Profil Organ-Organ Dalam pada Tikus Wistar Betina Dewasa.

PENELITI UTAMA : dr. Nia Kurnianingsih, M.Biomed

ANGGOTA : dr. Yhusi Karina Riskawati, M.Sc
 dr. Dewi Mustika, M.Biomed
 Rizka Dwi Hastuti
 Firsthascika Cleverin Putri
 Ni Kade Dwi Ariani
 Nurul Putri Andani
 Elissa Destianie

UNIT / LEMBAGA : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

TEMPAT PENELITIAN : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Prof. Dr. dr. Moch Istiadjid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr.Hk
 NIK. 160746683

Catatan :
 Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)



Lampiran 2. Formulir Etik Penelitian Kesehatan

FORMULIR ETIK PENELITIAN KESEHATAN

1.	Peneliti Utama (Title Unit Pelayanan) Multisenter Ya <input type="checkbox"/> Tidak <input checked="" type="checkbox"/>
2.	Judul Penelitian : Pengaruh Kombinasi Monosodium Glutamat dan Diet Tinggi Lemak Terhadap Berbagai Penanda Obesitas serta Profil Organ-Organ Dalam Pada Tikus Wistar Betina Dewasa
3.	Subjek Pasien <input type="checkbox"/> Non Pasien Hewan <input checked="" type="checkbox"/>
4.	Perkiraan waktu Penelitian yang dapat diselesaikan untuk tiap partisipan adalah selama 4 bulan
5.	<p>Ringkasan usulan penelitian yang mencakup objektif / tujuan penelitian/ manfaat / relevansi dari hasil penelitian dan alasan / motivasi untuk melakukan penelitian (ditulis dalam bahasa yang mudah dipahami oleh orang yang bukan dokter)</p> <p>Pola makan sehari-hari dapat mempengaruhi status kesehatan seseorang. Penggunaan zat aditif dan pola makan diet tinggi lemak penting untuk digaris bawahi pada era modernisasi dan globalisasi saat ini. Penggunaan monosodium glutamat (MSG) sebagai peningkat cita rasa makanan semakin meluas di masyarakat, mulai dari industri makanan, restoran hingga skala rumah tangga. Meskipun beberapa lembaga pengawas makanan diantaranya <i>Food and Drug Administration (FDA)</i> di Amerika serta Badan Pengawasan Obat dan Makanan di Indonesia menggolongkan MSG kedalam golongan aman dikonsumsi dalam jumlah dan ukuran tertentu, namun banyak penelitian yang masih menuai kontroversi mengenai pengaruh MSG terhadap kesehatan baik pada subyek hewan coba maupun manusia. Penggunaan MSG dalam dosis besar diketahui dapat menstimulasi reseptor NMDA secara berlebihan sehingga kanal kalsium akan membuka lebih lama. Hal ini mengakibatkan kalsium dalam jumlah besar akan memasuki sitoplasma sel sehingga mempengaruhi permeabilitas membran mitokondria. Peningkatan permeabilitas mitokondria akan menginduksi pengeluaran sitokrom-C yang akan mengaktifkan jalur apoptosis sel. Diduga MSG juga dapat menimbulkan kerusakan pada neuron hipotalamus sehingga mengganggu fungsi endokrin di dalam tubuh dengan dampak adanya obesitas dan kerusakan organ yang dipengaruhi, termasuk diantaranya adalah organ reproduksi.</p> <p>Pola makan diet tinggi lemak semakin meningkat dengan maraknya konsumsi makanan cepat saji di masyarakat. Semakin meningkatnya asupan lemak dari diet akan semakin meningkatkan risiko terjadinya obesitas terutama pada wanita yang lebih rentan mengalami obesitas. Obesitas juga terkait dengan timbulnya penyakit kardiovaskuler, hipertensi, diabetes melitus, gangguan fungsi reproduksi dan lain sebagainya Diet tinggi lemak juga dapat menimbulkan akumulasi lemak visceral yang dapat berpengaruh terhadap fungsi organ. Mengingat bahwa makanan tinggi lemak seringkali disajikan dengan penambahan MSG maka perlu diketahui bagaimana pengaruh kombinasi monosodium glutamat dan diet tinggi lemak terhadap berbagai penanda obesitas serta profil organ-organ dalam pada tikus wistar betina dewasa.</p> <p>Penelitian ini memiliki tujuan umum dan tujuan khusus. Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kombinasi monosodium glutamat dan diet tinggi lemak terhadap berbagai penanda obesitas serta profil organ-organ dalam reproduksi tikus wistar betina. Sedangkan tujuan khusus penelitian ini adalah mengetahui pengaruh kombinasi monosodium glutamat dan diet tinggi lemak terhadap berat badan tikus, indeks <i>lee</i>, berat lemak visceral, kadar trigliserida, kadar kolesterol total, kolesterol LDL, kadar kolesterol HDL, kadar glukosa darah, diameter aorta, berat organ (otak, hepar, ginjal, jantung, dan pankreas), profil organ reproduksi (jumlah sel epitel sekretorik, ketebalan sel otot polos tuba falopii, kongesti pembuluh darah medulla ovarium, jumlah folikel de graaf, jumlah folikel atretik, ketebalan endometrium dan siklus setrus), serta densitas neuron otak pada tikus wistar betina dewasa.</p>



	<p>Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai rujukan ilmiah bagi penelitian selanjutnya serta landasan informasi bagi masyarakat mengenai dampak kesehatan dari kombinasi MSG dan diet tinggi lemak. Sehingga diharapkan dari informasi tersebut dapat turut serta meningkatkan tingkat kesehatan masyarakat.</p>
6.	<p>Masalah etik (Nyatakan pendapat anda tentang masalah etik yang mungkin dihadapi)</p> <p>Masalah etik yang mungkin dihadapi dalam penelitian dengan menggunakan hewan coba adalah <i>hewan coba dapat mengalami gangguan kesehatan selama perlakuan. Untuk itu, maka dilakukan prinsip 3 R dalam protokol penelitian terhadap hewan coba, yaitu:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Replacement :</i> Meningkatkan bahwa eksperimen ini tidak dapat dilakukan langsung pada subyek manusia maka penelitian ini mengganti subyek dengan hewan coba dari kelas mamalia yaitu tikus wistar mengingat pengaruh yang akan dieksplorasi bersifat sistemik sehingga dibutuhkan hewan coba yang secara genetik mirip dengan manusia. 2. <i>Reduction :</i> Jumlah hewan coba tikus yang digunakan sesuai dengan jumlah sampel yaitu total 30 ekor tikus dengan rincian 5 ekor untuk setiap kelompok perlakuan. 3. <i>Refinement</i> Hewan percobaan diperlakukan secara manusiawi. Prinsip <i>refinement</i> berarti membebaskan hewan coba dari beberapa kondisi, yaitu: <ol style="list-style-type: none"> a) <i>Freedom from hunger and thirst</i> Hewan coba dipelihara dengan baik melalui pemberian pakan dan minum secara teratur sesuai komposisi dan pemantauan konsumsi pakan setiap hari. b) <i>Freedom from pain</i> Hewan percobaan dibebaskan dari rasa nyeri yang mungkin dapat timbul akibat prosedur penyondaan dan pembedahan melalui teknik sonde yang baik dan dilakukan oleh praktisi berpengalaman serta anestesi sebelum pembedahan. c) <i>Freedom from injury and disease</i> Kandang dibuat agar aman dan nyaman bagi tikus serta meminimalisir kemungkinan cedera bagi tikus. Kandang dan sekam juga dipelihara kebersihannya agar tikus terbebas dari penyakit. d) <i>Freedom from distress and feeling discomfort</i> Hewan coba ditempatkan di lingkungan yang nyaman dalam hal kebersihan, cahaya, suhu, dan kelembaban dan kebisingan agar tidak mengalami stres. e) <i>Freedom to express their normal behavior</i> Kepadatan hewan coba dalam kandang juga diperhatikan agar tidak menimbulkan stres pada hewan coba serta supaya hewan coba dapat mengekspresikan perilaku normal mereka.
7.	<p>Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, apakah percobaan pada hewan sudah dilakukan? Bila belum, sebutkan alasan untuk memulai penelitian ini langsung pada manusia</p> <p>Penelitian ini tidak menggunakan subyek manusia. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus wistar betina.</p>
8.	<p>Prosedur eksperimen (Frekuensi, interval, dan jumlah total segala tindakan invasive yang akan dilakukan, dosis dan cara pemberian obat, isotop, radiasi dan tindakan lain)</p> <p>Setelah melalui proses adaptasi selama 7 hari kemudian hewan coba tikus akan dikelompokkan secara acak ke dalam 6 kelompok (@ 5-ekor tikus), yaitu sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kelompok control negatif: tikus wistar yang diberi diet normal. 2. Kelompok control positif 1: tikus yang diberi diet tinggi lemak. 3. Kelompok control positif 2: tikus yang diberi diet normal+MSG 0,7 mg/gBB 4. Kelompok perlakuan 1: tikus yang diberi diet tinggi lemak+MSG 0,05 mg/gBB 5. Kelompok perlakuan 2 : tikus yang diberi diet tinggi lemak+MSG 0,2 mg/gBB. 6. Kelompok perlakuan 3: tikus yang diberi diet tinggi lemak+MSG 0,35 mg/gBB. <p>Diet normal tikus menggunakan campuran bahan yang terdiri dari: tepung jagung 615 gram, gula</p>



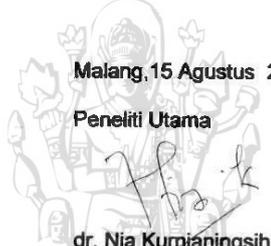
	<p>pasir 85 gram, <i>soybean oil</i> 45 gram, gelatin 65 gram, kasein 90 gram, CMC 51 gram, vitamin dan mineral 5 butir, serta air 750 ml. Kebutuhan pakan normal sebanyak 30 gr/ekor tikus/hari.</p> <p>Diet tinggi lemak menggunakan campuran bahan yang terdiri dari: tepung jagung 550 gram, gula pasir 457,5 gram, korsvet 275 gram, margarin 275 gram, <i>soybean oil</i> 130 gram, gelatin 130 gram, kasein 335 gram, CMC 132,5 gram, vitamin dan mineral 25 butir, air 375 gram, dan asam kolat 5 gram (Handayani, et al., 2012). Kebutuhan diet tinggi lemak yang diberikan sebanyak 30 gr/ekor tikus/ hari.</p> <p>MSG dilarutkan dalam aquades sebanyak 1 ml kemudian diberikan melalui sonde ke dalam gaster dengan frekuensi satu kali sehari. Keseluruhan prosedur dilakukan selama 56 hari.</p> <p>Pada hari ke-56 tikus akan dicek fase siklus estrusnya. Apabila sudah mencapai fase proestrus, maka tikus akan dilakukan pembedahan dengan terlebih dahulu dianestesi menggunakan injeksi ketamin secara intraperitoneal dengan dosis 0,2 ml, kemudian diambil organ yang akan diteliti. Setelah pembedahan dan pengambilan organ-organ dalam tikus, bangkai tikus yang tersisa dan tidak digunakan kembali akan dikubur di tanah dengan ukuran lebar 20cm x 20cm dan kedalaman 30 cm agar tidak terjadi pencemaran lingkungan.</p>
9.	<p>Bahaya potensial yang langsung atau tidak langsung segera atau kemudian dan cara mencegah atau mengatasi kejadian (termasuk rasa nyeri dan keluhan lain) :</p> <p>Prosedur pembedahan dapat menyebabkan nyeri oleh karena itu tikus akan dianestesi terlebih dahulu sebelum dilakukan pembedahan.</p>
10	<p>Pengalaman terdahulu (sendiri atau orang lain) dari tindakan yang hendak diterapkan :</p> <p>Penelitian ini belum pernah diterapkan di ruang lingkup Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, tetapi sudah pernah dilakukan oleh orang lain untuk melihat efek MSG dan diet tinggi lemak. Penelitian tersebut dilakukan oleh Collison et al. (2010) dengan judul "<i>Dietary Trans-Fat Combined with Monosodium Glutamate Induces Dyslipidemia and Impairs Spatial Memory</i>" yang menggunakan mencit jantan dan betina jenis C57BL/6 J dengan kombinasi MSG dosis 91,21 mg/kg BB mencit dan asam lemak jenuh (TFA) dengan kandungan lemak 28% dari total diet. Kombinasi MSG dan TFA menyebabkan peningkatan <i>central adiposity</i> dan dislipidemia serta rusaknya perilaku kognitif dari tikus. Selain itu penelitian ini menunjukkan efek kombinasi yang lebih parah pada tikus betina daripada tikus jantan.</p>
11	<p>Bila penelitian ini menggunakan orang sakit dan dapat memberi manfaat untuk subjek yang bersangkutan, uraikan manfaat itu :</p> <p>Penelitian ini tidak menggunakan orang sakit, tetapi menggunakan hewan coba tikus wistar betina.</p>
12	<p>Bagaimana cara memilih pasien / sukarelawan sehat ?</p> <p>Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus wistar dengan kriteria inklusi sebagai berikut :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tikus <i>Rattus norvegicus</i> galur wistar berjenis kelamin betina 2. Berat badan tikus 140-200 gram 3. Usia 6-8 minggu 4. Tidak adakelainan morfologi 5. Tikus dengan bulu rata berwarna putih, sehat, mata jernih, bergerak aktif, dan tingkah laku normal. Tikus yang tidak mau makan ataupun mati tidak diikuti dalam penelitian ini
13	<p>Bila peneliti ini menggunakan subjek manusia, jelaskan hubungan antara peneliti utama dengan subjek yang diteliti :</p> <p>Dokter - Pasien <input type="checkbox"/> Guru - Murid <input type="checkbox"/> Majikan - anak buah <input type="checkbox"/> Lainnya <input type="checkbox"/></p> <p>Penelitian ini tidak menggunakan subyek manusia, tetapi menggunakan hewan coba tikus wistar</p>



	betina.
14	Bila peneliti ini menggunakan orang sakit, jelaskan diagnosis dan nama dokter yang bertanggung jawab merawatnya. Bila menggunakan orang sehat jelaskan cara pemeriksaan kesehatannya. Penelitian ini tidak menggunakan orang sakit, tetapi menggunakan hewan coba tikus wistar betina.
15	Jelaskan cara pencatatan selama penelitian, termasuk efek samping dan komplikasi bila ada Semua kegiatan dalam penelitian akan dicatat dalam buku kerja (<i>log book</i>) penelitian.
16	Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, jelaskan bagaimana cara member tahu dan mengajak subjek (lampirkan contoh surat persetujuan subjek) bila pemberitahuan dan kesediaan subjek bersifat lisan, atau bila karena sesuatu hal subjek tidak dapat atau tidak perlu dimintakan persetujuan, berilah alasan yang kuat untuk itu. Penelitian ini tidak menggunakan subyek manusia, tetapi menggunakan hewan coba tikus wistar betina.
17	Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia apakah subjek dapat ganti rugi bila ada gejala efek samping ?berapa banyak? Penelitian ini tidak menggunakan subyek manusia
18	Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, apakah subjek diasuransikan Ya <input type="checkbox"/> Tidak <input type="checkbox"/> Penelitian ini tidak menggunakan subyek manusia, tetapi menggunakan hewan coba tikus wistar betina.

Malang, 15 Agustus 2017

Peneliti Utama



dr. Nia Kurnianingsih, M.Biomed

Telah diperiksa dan disetujui pada tanggal : 29 AUG 2017

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan



Prof. Dr.dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS, M.Hum



Lampiran 3. Analisa Data

Tabel Uji Asumsi Normalitas Jumlah Siklus Estrus

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
lamasiklus	Kontrol Negatif	.283	4	.	.863	4	.272
	Kontrol + 1	.333	4	.	.763	4	.051
	Kontrol + 2	.155	4	.	.998	4	.995
	P1	.250	4	.	.927	4	.577
	P2	.283	4	.	.863	4	.272
	P3	.267	4	.	.841	4	.199

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel Uji Asumsi Homogenitas Jumlah Siklus Estrus

Test of Homogeneity of Variances

lamasiklus

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.453	5	18	.254

Tabel Hasil Pengujian ANOVA Jumlah Siklus Estrus

ANOVA

lamasiklus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16.375	5	3.275	.639	.673
Within Groups	92.250	18	5.125		
Total	108.625	23			



Tabel Uji Tukey HSD Jumlah Siklus Estrus

Multiple Comparisons

Iamasiklus

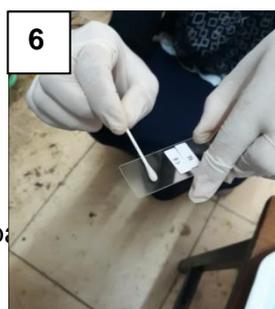
Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Kontrol + 1	1.75000	1.60078	.878	-3.3373	6.8373
	Kontrol + 2	1.75000	1.60078	.878	-3.3373	6.8373
	P1	1.25000	1.60078	.967	-3.8373	6.3373
	P2	.00000	1.60078	1.000	-5.0873	5.0873
	P3	2.00000	1.60078	.807	-3.0873	7.0873
Kontrol + 1	Kontrol Negatif	-1.75000	1.60078	.878	-6.8373	3.3373
	Kontrol + 2	.00000	1.60078	1.000	-5.0873	5.0873
	P1	-.50000	1.60078	1.000	-5.5873	4.5873
	P2	-1.75000	1.60078	.878	-6.8373	3.3373
	P3	.25000	1.60078	1.000	-4.8373	5.3373
Kontrol + 2	Kontrol Negatif	-1.75000	1.60078	.878	-6.8373	3.3373
	Kontrol + 1	.00000	1.60078	1.000	-5.0873	5.0873
	P1	-.50000	1.60078	1.000	-5.5873	4.5873
	P2	-1.75000	1.60078	.878	-6.8373	3.3373
	P3	.25000	1.60078	1.000	-4.8373	5.3373
P1	Kontrol Negatif	-1.25000	1.60078	.967	-6.3373	3.8373
	Kontrol + 1	.50000	1.60078	1.000	-4.5873	5.5873
	Kontrol + 2	.50000	1.60078	1.000	-4.5873	5.5873
	P2	-1.25000	1.60078	.967	-6.3373	3.8373
	P3	.75000	1.60078	.997	-4.3373	5.8373
P2	Kontrol Negatif	.00000	1.60078	1.000	-5.0873	5.0873
	Kontrol + 1	1.75000	1.60078	.878	-3.3373	6.8373
	Kontrol + 2	1.75000	1.60078	.878	-3.3373	6.8373
	P1	1.25000	1.60078	.967	-3.8373	6.3373
	P3	2.00000	1.60078	.807	-3.0873	7.0873
P3	Kontrol Negatif	-2.00000	1.60078	.807	-7.0873	3.0873
	Kontrol + 1	-.25000	1.60078	1.000	-5.3373	4.8373
	Kontrol + 2	-.25000	1.60078	1.000	-5.3373	4.8373
	P1	-.75000	1.60078	.997	-5.8373	4.3373
	P2	-2.00000	1.60078	.807	-7.0873	3.0873

Lampiran 4. Dokumentasi Selama Penelitian



Gambar 1: Pemeliharaan tikus selama aklimatisasi, masing-masing tikus mendapatkan 1 kandang.



persiap

uhkan ur

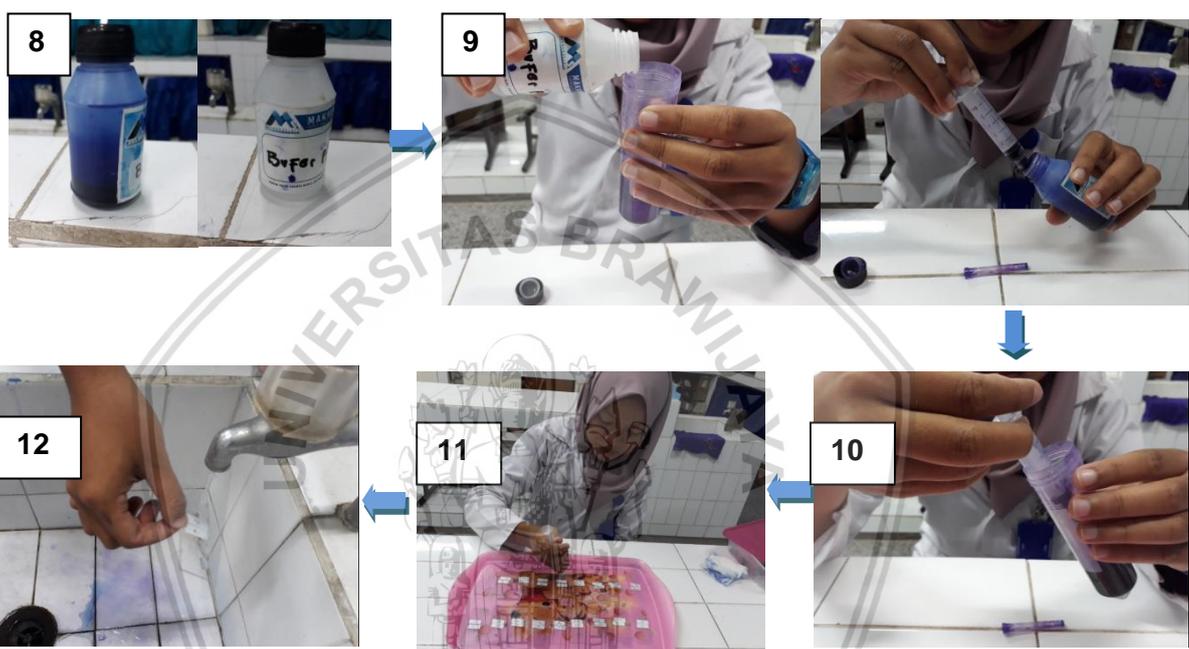
Gambar 3: proses persiapan kaca objek dan *cotton bud* yang di celupkan ke larutan NS untuk swab vagina tikus.

Gambar 4: cara memegang tikus saat melaksanakan swab vagina.

Gambar 5: memasukkan *cotton bud* ke dalam vagina tikus, kemudian diputar perlahan sebanyak 1 atau 2 kali untuk mendapat lendir vagina tikus.

Gambar 6: mengoleskan *cotton bud* ke kaca objek sesuai kode tikus.

Gambar 7: memfiksasi apusan lendir vagina setelah dikeringkan terlebih dahulu, dengan etanol dan menunggu selama 2-5 menit.



Gambar 8: menyiapkan bahan untuk pewarnaan: *phospat* dan giemsa.

Gambar 9: mengambil *buffer phospat* 5 ml dan giemsa 0,5 ml, kemudian mencampurkan keduanya di tabung reaksi yang disediakan.

Gambar 10: mengambil campuran *phospat* dan giemsa dengan spuit.

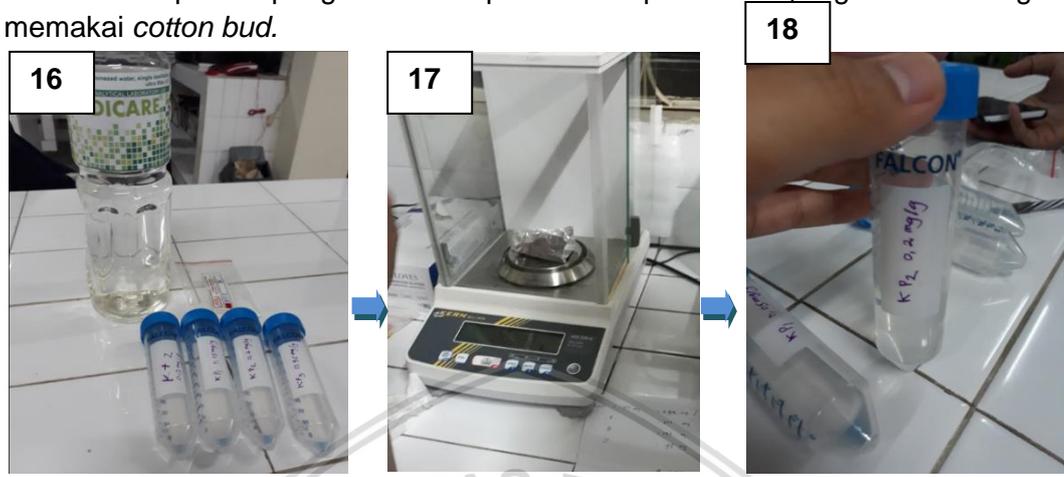
Gambar 11: melakukan pewarnaan pada apusan lendir vagina yang sebelumnya difiksasi dengan etanol. Ditunggu 5-10 menit.

Gambar 12: membilas *object glass* di bawah air yang mengalir.



Gambar 14: tikus yang mengalami skabies.

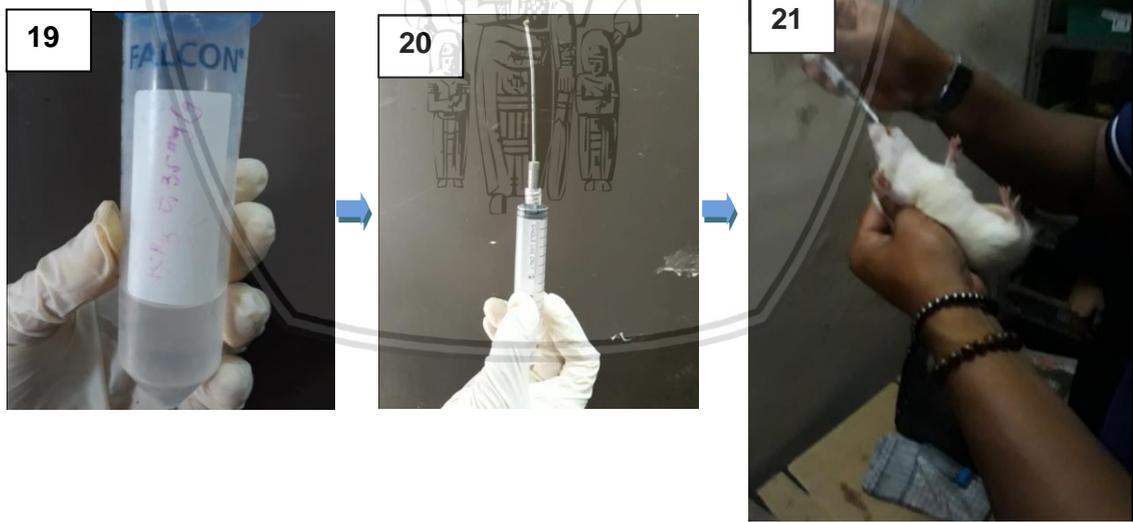
Gambar 15: proses pengolesan salep *scabimite* pada tikus yang skabies dengan memakai *cotton bud*.



Gambar 16: persiapan alat untuk pembuatan larutan MSG: tabung plastik 4 buah, *aquades*, dan MSG 99%.

Gambar 17: penimbangan MSG sesuai dosis masing-masing kelompok.

Gambar 18: penyampuran MSG dan *aquades* sesuai dosis masing-masing kelompok.



Gambar 19: persiapan larutan MSG.

Gambar 20: alat sonde.

Gambar 21: proses penyondean MSG sesuai dengan dosis masing-masing kelompok perlakuan oleh tenaga ahli.



Gambar 22: proses penimbangan bahan untuk pembuatan pakan.

Gambar 23: pakan tikus yang sudah jadi dan di bentuk pipih.

