

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Madu adalah pemanis alami yang dihasilkan oleh lebah dari sari bunga atau bagian lain tanaman.¹ Selain sebagai pemanis, madu juga digunakan sebagai pengobatan alternatif untuk beberapa penyakit.² Penggunaan madu sebagai pengobatan alternatif sangat populer pada kerusakan sel paru pada penyakit paru obstruksi kronis dan kanker paru karena memiliki sifat antioksidan.³

Madu mengandung 75%-80% karbohidrat, 17%-20% air, 1%-20% mineral dan zat organik. Secara umum, madu mengandung 65%-70% monosakarida, disakarida, trisakarida, oligosakarida dan mengandung kurang lebih 200 zat organik termasuk banyak asam amino, vitamin, mineral dan enzim. Madu juga mengandung komponen yang memiliki efek antioksidan seperti senyawa fenolat, asam askorbat, tokoferol, katalase, *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione peroxide* (GPx), *Maillard Reaction Products* (MRP) dan senyawa antioksidan lainnya yang dapat melindungi organ seperti hepar dari kerusakan stres oksidatif.^{4,5} Saat ini penggunaan madu sebagai obat tradisional dipercaya dapat menyembuhkan beberapa penyakit, seperti untuk mengobati pharyngitis. Dimana mengkonsumsi 1 sendok makan atau lebih dipercaya memiliki efektivitas yang baik bagi tubuh.⁶

Siklamat merupakan jenis pemanis sintesis yang banyak digunakan di Indonesia karena memiliki tingkat kemanisan yang tinggi tanpa rasa pahit. Di Indonesia, siklamat mendapat izin edar dengan batas penggunaan maksimum 1.250 mg/kg produk dalam bentuk asam siklamat.⁷ Namun, penyalahgunaan pemanis buatan melebihi batas yang ditentukan biasa dilakukan oleh para produsen

makanan dan industri rumah tangga yang belum mendapat penyuluhan. Penelitian yang dilakukan oleh Umami Hiras Habisukan pada tahun 2018 dengan judul pengaruh natrium siklamat terhadap histopatologi organ mencit (*Mus musculus*) dan sumbangsuhnya pada materi struktur dan fungsi jaringan hewan di SMA/MA didapati hasil adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol yang hanya diberikan aquades dan tidak diberi natrium siklamat dengan kelompok perlakuan yang diberikan natrium siklamat. Pada kelompok perlakuan dijumpai kerusakan struktur histologis paru-paru mencit dan juga penurunan jumlah sel parenkim dan bertambahnya luas alveolus. Kerusakan struktur histologis paru-paru dinilai berdasarkan jumlah sel parenkim paru-paru dan luas alveolus yang mengalami emfisema, yaitu destruksi serta distensi paru-paru.⁸

Di Indonesia ada beberapa penelitian tentang kandungan fenolat, senyawa *volatile*, vitamin A dan C, *Maillard Reaction Products* (MRP) dan asam organik pada madu terhadap kerusakan paru-paru. Penelitian berjudul pengaruh pemberian dosis bertingkat madu terhadap gambaran mikroskopis paru pada mencit strain balb/c jantan yang diberi paparan asap rokok yang dilakukan oleh Yuda Nabella Prameswari pada tahun 2014 mendapatkan hasil bahwa pemberian madu dengan dosis yang semakin tinggi, memperlihatkan penurunan jumlah sel-sel limfosit yang semakin jelas di jaringan interalveolar dan sel-sel eritrosit di luar pembuluh darah.⁹ Penelitian dengan judul aktivitas anti kanker dan antioksidan madu di pasaran lokal Indonesia oleh La Ode Sumarlin, dkk pada tahun 2014 juga mendapati hasil bahwa madu lokal memiliki potensi sebagai anti kanker paru dan antioksidan.¹⁰ Hasil penelitian La Ode Sumarlin, dkk sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Dinar Suksmayu Saputri dan Yolli Eka Putri dengan judul aktivitas antioksidan madu hutan di beberapa kecamatan di Sumbawa pada tahun 2017 didapati hasil bahwa madu hutan di beberapa daerah tersebut mengandung

senyawa fenol (asam galat) sebesar 0,0633-0,3875 mg/g dan memiliki aktivitas antioksidan antara 3,3365-30,9680% dengan nilai IC50 60,2-572,3 mg/mL.¹¹ Penelitian yang berjudul komponen bioaktif pada madu karet (*Hevea brasiliensis*) madu kaliandra (*Calliandra callothyrsus*) dan madu randu (*Ceiba pentandra*) yang dilakukan oleh Ustadi, dkk mendapatkan hasil bahwa jenis madu dari sumber nektar yang berbeda memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda, serta terdapat korelasi yang positif antara parameter bioaktif dan aktivitas antioksidan. Pada penelitian tersebut didapati bahwa madu kaliandra memiliki kandungan bioaktif dan aktifitas antioksidan paling tinggi dibandingkan dengan madu karet dan madu randu.¹²

Berdasarkan data di atas, peneliti tertarik untuk meneliti pengaruh pemberian madu terhadap gambaran kerusakan paru tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus L.*) yang diinduksi natrium siklambat.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah pemberian madu dapat mencegah kerusakan histologis sel paru pada tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus L.*) yang diinduksi natrium siklambat ?

1.3. Hipotesis Penelitian

Madu dapat mencegah kerusakan histologis sel paru pada tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus L.*) yang diinduksi natrium siklambat.

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui apakah pemberian madu sebagai antioksidan dapat mencegah kerusakan histologis sel paru tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus L.*) yang diinduksi natrium siklambat.

1.4.2. Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui apakah pemberian madu secara oral dapat mengurangi jumlah kerusakan parenkim paru dan luas kerusakan alveolus paru pada tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus L.*) yang terpapar natrium siklamat.
- b. Untuk mengetahui berapa dosis optimum madu yang dapat menimbulkan efek sebagai pulmoprotektor terhadap sel paru yang diinduksi natrium siklamat.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Bagi Peneliti

Menambah pengetahuan dan pengalaman dalam melakukan penelitian dan penulisan karya ilmiah khususnya mengenai penelitian eksperimental pra-klinik pada hewan coba tikus jantan galur wistar.

1.5.2. Bagi Instansi

Menambah referensi di Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan, sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk melakukan penelitian yang lebih dalam bagi peneliti lain.

1.5.3. Bagi Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan masyarakat mengenai pengaruh pemberian madu sebagai zat yang dapat mengurangi kerusakan paru yang disebabkan oleh pemakaian natrium siklamat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

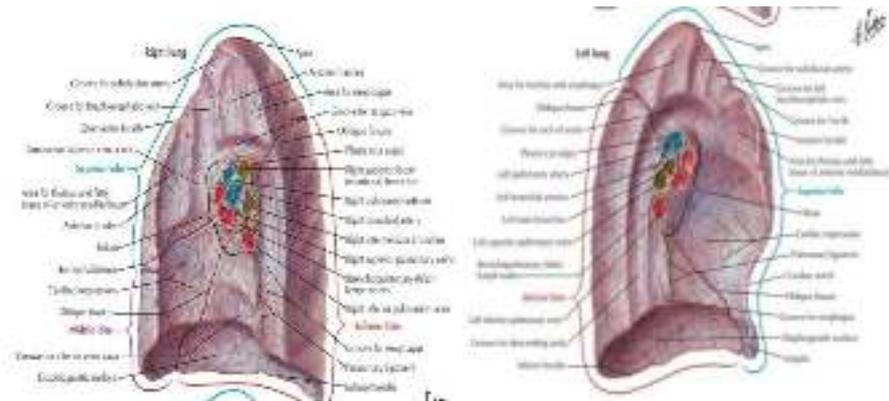
2.1. Paru-Paru

2.1.1. Anatomi

Paru merupakan organ pernapasan yang terdapat di rongga toraks dan dipisahkan oleh mediastinum menjadi paru-paru kanan dan paru-paru kiri. Paru dibagi menjadi beberapa lobus yaitu tiga lobus di paru-paru kanan dan dua lobus di paru-paru kiri. Ukuran paru kanan berbeda dengan paru kiri. Paru kanan lebih besar dan lebih berat dari paru kiri, namun lebih pendek karena letak cupula dekstra diafragma lebih tinggi dan terdapat jantung serta perikardium yang letaknya lebih menonjol ke kiri. Setiap paru memiliki apeks, basis, tiga permukaan yaitu fasies kostalis, fasies mediastinalis dan fasies diafragmatika, dan tiga batas yaitu margo anterior, margo inferior dan margo posterior.¹³

Rongga paru dilapisi oleh membran pleura yang menutupi permukaan luar paru. Pleura terdiri dari 2 lapisan yaitu pleura viseralis yang membentuk permukaan luar paru, dan pleura parietalis yang melapisi rongga paru. Diantara dua lapisan ini terdapat ruang potensial yang berisi cairan pleura yang disebut cavitas pleuralis yang berfungsi untuk pelumas kedua lapisan pleura saat bergeser satu sama lain selama respirasi.¹³

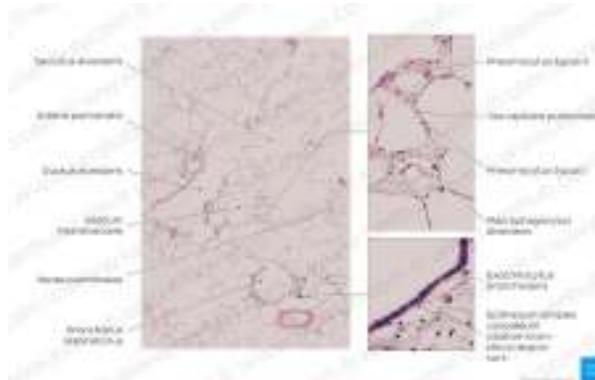
dalam pembuluh darah arteri dari paru ke atrium kiri jantung. Arteri bronkialis menyuplai darah untuk nutrisi struktur-struktur yang menyusun akar paru, jaringan penunjang paru dan pleura viseralis. Vena bronkialis mengalirkan bagian darah yang disuplai ke paru oleh arteri bronkialis.¹⁵



Gambar 2.2. Arteri dan vena pada paru¹⁴

Persarafan paru berasal dari pleksus pulmonalis di anterior dan posterior akar paru, mengandung serabut parasimpatis dari nervus vagus (N X) dan serabut simpatis dari trunkus simpaticus. Serabut parasimpatis adalah motorik terhadap otot polos bronkial sehingga menimbulkan efek bronkokonstriksi, merupakan inhibitor terhadap pembuluh darah paru sehingga menimbulkan efek vasodilator, dan sekretorik terhadap kelenjar cabang bronkial (sekretomotorik). Serabut simpatis bekerja berlawanan dengan serabut parasimpatis. Serabut simpatis bersifat inhibitori terhadap otot bronkial (bronkodilator), motorik terhadap pembuluh darah paru (vasokonstriktor), dan inhibitori terhadap kelenjar alveolar cabang bronkial.¹³

2.1.2. Histologi



Gambar 2.3. Histologi paru¹⁶

Percabangan paru-paru dari bronkus utama hingga percabangan terkecil mencapai diameter hingga 5 mm. Lumen bronkus primer dikelilingi oleh lempeng kartilago hialin. Pada saluran lumen bronkus ditemukan lamina propria yang mengandung banyak serat elastin, kelenjar mukosa, serosa dan limfosit.¹⁷

Percabangan selanjutnya dari bronkus yaitu bronkiolus. Bronkiolus berukuran ± 5 mm dan tidak memiliki kartilago yang mengelilingi mukosanya. Bronkiolus besar dilapisi oleh epitel bertingkat silindris bersilia. Semakin bercabang menjadi bronkiolus terminalis, epitelnya menjadi epitel selapis silindris bersilia atau selapis kuboid. Epitel bronkiolus terminalis mengandung sel Clara yang menyekresi komponen surfaktan.¹⁷

Bronkiolus terminalis bercabang dua atau lebih menjadi bronkiolus respiratorius. Bronkiolus respiratorius dilapisi oleh epitel kuboid bersilia dan sel Clara, namun hingga tepi muara alveolus, epitel bronkiolus menyatu dengan sel-sel alveolus gepeng yang melapisi duktus alveolaris dan alveolus. Duktus alveolaris bermuara ke dalam atrium di dua sakkus alveolaris yang dikelilingi oleh serat elastin dan serat retikular. Serat elastin dapat membantu alveolus mengembang sewaktu inspirasi dan berkontraksi secara pasif selama ekspirasi. Sedangkan serat retikular mencegah pengembangan yang

berlebih dan kerusakan kapiler-kapiler halus dan septa alveolar yang tipis.¹⁷

Diantara alveolus terdapat dinding yang disebut septum interalveolus yang memiliki serat elastin dan kolagen. Pada septum interalveolus dijumpai pori-pori yang berdiameter 10-15 μm yang dapat meningkatkan sirkulasi kolateral udara ketika sebuah bronkiolus tersumbat. Alveolus terbagi menjadi dua tipe sel yaitu sel alveolus tipe I dan II.¹⁸

Sel alveolus tipe I adalah sel yang melapisi 97% permukaan alveolus dan memiliki taut kedap untuk mencegah perembesan cairan jaringan ke dalam ruang udara alveolus. Sel ini dapat membentuk sawar dengan ketebalan minimal sehingga dapat dilalui gas. Organel-organel yang terdapat di sel alveolus tipe I ini yaitu inti sel, retikulum endoplasma, apparatus Golgi dan mitokondria. Di bagian inti terdapat sitoplasma yang mengandung banyak vesikel pinositotik yang berperan pada pergantian surfaktan dan pembuangan partikel kontaminan kecil dari permukaan luar.¹⁸

Sel alveolus tipe II berada diantara sel-sel alveolus tipe I dengan ciri sitoplasma bervesikel yang khas atau berbusa karena adanya badan lamella yang mengandung fosfolipid, glikosaminoglikan dan protein yang diproduksi secara kontinu dan dilepaskan di permukaan apikal sel. Badan lamella akan menghasilkan materi berupa surfaktan paru sehingga terbentuk lapisan ekstrasel yang menurunkan tegangan permukaan di alveolus yang berarti bahwa lebih sedikit daya inspirasi yang diperlukan untuk mengisi alveolus sehingga mempermudah kerja pernapasan.¹⁸

Makrofag alveolus yang disebut juga sel debu, terdapat di alveolus dan septum interalveolus. Cairan bronkoalveolar merupakan gabungan dari cairan pelapis alveolus dengan mukus bronkus yang mengandung enzim litik misalnya lisozim, kolagenase dan β -glukuronidase yang berasal dari sel Clara, sel tipe II dan makrofag

alveolus. Cairan ini dapat menghalau partikel halus dan komponen berbahaya yang berasal dari udara inspirasi. Inhalasi gas toksik dapat membunuh sel tipe I dan tipe II yang melapisi alveolus paru. Ketika stress toksik meningkat, sel Clara akan membelah dan menghasilkan sel alveolus yang baru.¹⁷

Pleura terdiri atas sel-sel mesotel skuamosa selapis yang berada pada lapisan jaringan ikat tipis yang mengandung serat kolagen dan elastin. Rongga pleura dapat mengandung cairan atau udara pada keadaan patologis tertentu.¹⁸

2.1.3. Metode Penghitungan Kerusakan Paru

Gambaran kerusakan sel paru diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x pada seluruh lapangan pandang.¹⁹ Kerusakan paru ditentukan dari penjumlahan adanya oedema alveolus, destruksi dinding alveoli dan infiltrasi radang.²⁰

Kriteria penilaian jumlah kerusakan alveolus menurut Hansel dan Barnes per 100 sel.²⁰

Kriteria	Keterangan
Normal	Tidak terdapat kerusakan histologis
Kerusakan ringan	Kerusakan alveolus paru >0% - <30% dari seluruh lapangan pandang
Kerusakan sedang	Kerusakan alveolus paru >30% - 60% dari seluruh lapangan pandang
Kerusakan berat	Kerusakan alveolus paru >60% dari seluruh lapangan pandang

2.2. Madu

2.2.1. Definisi Madu

Madu merupakan cairan alami yang memiliki rasa manis yang dihasilkan oleh lebah madu dari sari bunga atau bagian lain tanaman atau ekskresi serangga. Sumber madu dikelompokkan menjadi floral dan non-floral. Madu non-floral adalah madu yang dihasilkan dari

ekstrak jaringan tumbuhan atau buah, maupun ekskresi serangga pada tanaman. Madu bisa didapatkan dari satu jenis bunga yang sama atau beberapa jenis nektar bunga yang berbeda.¹

2.2.2. Kegunaan Madu

Penggunaan madu sebagai pengobatan alternatif sudah banyak digunakan dalam dunia kesehatan hingga saat ini. Pada zaman kuno, madu digunakan dalam pengobatan luka bakar, gangguan gastrointestinal, asma, infeksi dan beberapa luka kronis. Avicenna, ilmuwan dari Iran menyatakan bahwa pemberian madu merupakan salah satu pengobatan tuberkulosis.⁵ Saat ini madu juga digunakan sebagai antibakterial pada penyakit faringitis dan zat dekstrometorfan untuk meredakan batuk.²¹ Selain sebagai antibakterial, madu juga dapat digunakan sebagai antiinflamasi pada penyakit pneumonia dimana madu dapat mencegah perluasan radang paru sehingga mengurangi produksi mukus dan ronkhi tidak terdengar lagi pada saat auskultasi. Madu juga dapat membantu melindungi tubuh dari radikal bebas penyebab kerusakan sel paru pada penyakit paru obstruksi kronis dan kanker paru, karena memiliki sifat antioksidan.²²

2.2.3. Kandungan Madu

Secara umum madu memiliki pH 3.9 dengan rentang antara 3.4-6.1 dan kandungan asam 0.57% dengan rentang 0.17-11.7% terutama asam glukonat. Madu juga mengandung protein (0.26%), nitrogen (0.04%), asam-asam amino (0.05-0.10%) dan titik isoelektriknya pada 4.3. Zat-zat atau senyawa yang terkandung dalam madu sangat kompleks. Saat ini telah teridentifikasi 181 macam zat atau senyawa dalam madu. Komposisi madu ditentukan oleh dua faktor utama, yakni komposisi nektar asal madu yang bersangkutan dan faktor-faktor eksternal tertentu. Sebenarnya sulit mengharapkan mutu madu yang sama, karena mutu madu dipengaruhi oleh iklim, topografi dan pola pertanian yang berbeda, cara pengujian sampel

yang berbeda, lama penyimpanan sampel yang dianalisis, perbedaan jenis dan asal bunga penghasil nektar.²³

Setiap 1 kg madu mengandung 3.280 kalori. Nilai kalori pada 1 kg madu sama dengan 50 butir telur atau setara dengan 5,575 liter susu atau 1,680 kg daging. Karbohidrat merupakan komponen utama madu dan jumlahnya sekitar 80%. Monosakarida berupa levulosa (fruktosa) dan dekstrosa (glukosa) mencakup 85- 90% dari karbohidrat yang terdapat dalam madu. Selebihnya adalah golongan disakarida, polisakarida dan oligasakarida. Kandungan levulosa dan dekstrosa inilah yang membedakan antara madu dan gula pasir yang kandungan gulanya adalah sukrosa. Levulosa mempunyai rasa manis yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan dekstrosa. Campuran dekstrosa dan levulosa dengan kadar yang sebanding disebut dengan gula invert. Gula invert didefinisikan juga sebagai campuran D-dekstrosa dan D-levulosa yang diperoleh dengan hidrolisis asam atau enzimatik dari sukrosa.²³

Madu juga memiliki kandungan vitamin, asam, mineral dan enzim yang berguna bagi tubuh manusia. Madu juga mengandung asam organik yang terdiri dari asam glikolat, asam format, asam laktat, asam sitrat, asam asetat, asam oksalat, asam malat dan asam tartarat yang bermanfaat bagi metabolisme tubuh manusia. Asam laktat mengandung zat laktobasilin yaitu zat penghambat pertumbuhan sel kanker dan tumor. Sedangkan asam amino bebas dalam madu mampu membantu menyembuhkan penyakit, dan merupakan bahan pembentuk neurotransmitter atau senyawa yang berperan dalam mengoptimalkan fungsi otak.²⁴ Madu yang kaya mineral akan memiliki nilai pH yang tinggi lebih dari 6,1 dan jika nilai pH kurang dari 3,4 madu dalam kategori pH rendah. Nilai pH yang cukup rendah dari madu ini disebabkan oleh beberapa kandungan asam organik yang terdapat dalam madu. Asam-asam utama yang terdapat dalam madu antara lain asetat, butirat, format, glukonat, laktat, maleat,

oksalat, piroglutamat, sitrat, suksinat, glikolat, α -ketoglutarat, piruvat, 2,3-fosfoglisarat, α,β -gliserofosfat dan glukosa-6-fosfat. Asam glukonat adalah asam yang utama dalam madu, dihasilkan oleh dektrosa melalui enzim yang ditemukan dalam madu (glukosa oksidase).²³

K, Na dan Mg merupakan kandungan mineral dengan konsentrasi yang banyak dalam madu, sedangkan Fe, Mn, Cu, Zn, Al, B dan Sr juga terdapat dalam madu tetapi dalam konsentrasi yang sedikit. Konsentrasi mineral yang terdapat dalam madu tergantung dari asal sari bunga yang dihisap oleh lebah. Jika bunga yang ditanam banyak mengandung mineral (zat besi, tembaga dan mangan), maka madu yang dihasilkanpun berwarna gelap.^{4,24}

Antioksidan seperti fenolat, senyawa *volatile*, *Maillard Reaction Products* (MRP) dan vitamin A, C dalam madu memiliki daya aktif tinggi serta bisa meningkatkan perlawanan tubuh terhadap tekanan oksidasi (stres oksidatif).^{23,24} Secara umum madu mengandung enzim-enzim superoksida, amilase, glukosa oksidase, katalase, invertase, diastase, peroksidase, fosfatase dan enzim-enzim proteolitik. Semua enzim-enzim ini berasal dari nektar, serbuk sari dan sekresi kelenjar saliva pada lebah.²³

2.2.4. Jenis-Jenis Madu

Madu dapat digolongkan berdasarkan asal nektarnya dan berdasarkan cara pengolahannya. Berdasarkan asal nektarnya, madu dibedakan menjadi: madu flora, madu ekstra flora dan madu embun.

Madu flora yaitu madu yang bersumber dari nektar bunga. Madu flora dibagi menjadi dua berdasarkan jumlah jenis tanamannya, yaitu madu uniflora dan multiflora. Madu uniflora berasal dari satu jenis tanaman yang sama. Madu uniflora juga biasa disebut dengan madu ternak. Contoh jenis madu uniflora seperti madu randu, madu kelengkeng dan madu rambutan. Madu multiflora berasal dari beberapa jenis tanaman. Salah satu contoh madu multiflora adalah

madu hutan yang berasal dari lebah liar. Madu ekstra flora yaitu madu yang bersumber dari nektar selain bunga misalnya nektar dari daun, cabang atau batang. Madu embun yaitu madu yang dihasilkan dari cairan hasil sekresi serangga yang terdapat pada bagian tanaman yang kemudian dihisap dan dikumpulkan dalam sarang lebah. Contoh serangga yang menghasilkan madu embun yaitu yang berasal dari family *Lechanidae*, *Psyllidae* atau *Lechnidae*.²⁵

Berdasarkan cara pengolahannya maka madu dikelompokkan menjadi: madu peras dan madu ekstraksi. Madu peras yaitu madu yang diperoleh langsung dari perasan sarangnya. Madu ekstraksi yaitu madu yang diperoleh dari hasil proses sentrifugasi.²⁶

2.3. Natrium Siklamat

Natrium siklamat merupakan pemanis buatan yang mempunyai rasa manis tanpa ada rasa ikutan yang kurang disenangi atau rasa pahit. Pemanis ini mempunyai rasa manis \pm 30 kali sukrosa dan bersifat mudah larut dalam air. Natrium siklamat sering digunakan sebagai bahan pemanis yang tidak mengandung nilai gizi (*non-nutritive*) dalam industri pangan untuk mengganti penggunaan sukrosa atau yang sering kita kenal dengan gula pasir atau gula tebu. Karena bersifat tahan panas, siklamat sering digunakan dalam pangan yang diproses dalam suhu tinggi, misalnya pangan dalam kaleng.²⁷

Tingkat kemanisan yang tinggi dan rasanya yang enak (tanpa rasa pahit) tidak membuat natrium siklamat aman dikonsumsi dalam jumlah yang besar. Penelitian yang dilakukan oleh *National Academy Of Science* pada tahun 1968 mendapat hasil bahwa tikus yang diberikan natrium siklamat dapat mengalami kanker kantong kemih. Hasil metabolisme natrium siklamat yaitu sikloheksilamin bersifat karsinogenik dan radikal bebas. Oleh karena itu, ekskresinya melalui urin dapat merangsang pertumbuhan tumor. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa natrium siklamat dapat menyebabkan pengecilan testikular dan kerusakan kromosom. Penelitian *Academy Of Science*

pada pada tahun 1985 melaporkan bahwa natrium siklambat maupun turunannya (sikloheksiamin) tidak bersifat karsinogenik, tetapi diduga sebagai promotor tumor. Sampai saat ini hasil penelitian mengenai dampak natrium siklambat terhadap kesehatan masih diperdebatkan. Adanya peraturan bahwa penggunaan natrium siklambat dan sakarin masih diperbolehkan, serta kemudahan mendapatkan natrium siklambat dengan harga yang relatif murah dibandingkan dengan gula alam, menyebabkan produsen pangan dan minuman terdorong untuk tetap menggunakan kedua jenis pemanis buatan tersebut di dalam produk.²⁷

Di Indonesia, penggunaan natrium siklambat sebagai bahan tambahan makanan pemanis sintetis diatur dan diawasi oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM). Dalam Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 033 tahun 2012 tentang Bahan Tambahan Pangan, disebutkan bahwa bahan tambahan pangan termasuk pemanis sintetis hanya boleh digunakan dengan tidak melebihi batas maksimum penggunaan dalam kategori pangan. Batas maksimum penggunaan natrium siklambat sebagai bahan tambahan pangan diatur dalam Peraturan Kepala Badan Pengawasan Obat dan Makanan Nomor 4 tahun 2014 tentang Batas Maksimum Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Pemanis. Pada Peraturan tersebut juga tertera bahwa batas maksimum penggunaan natrium siklambat berbeda pada setiap kategori pangan.²⁸

2.4. Efek Antioksidan Madu

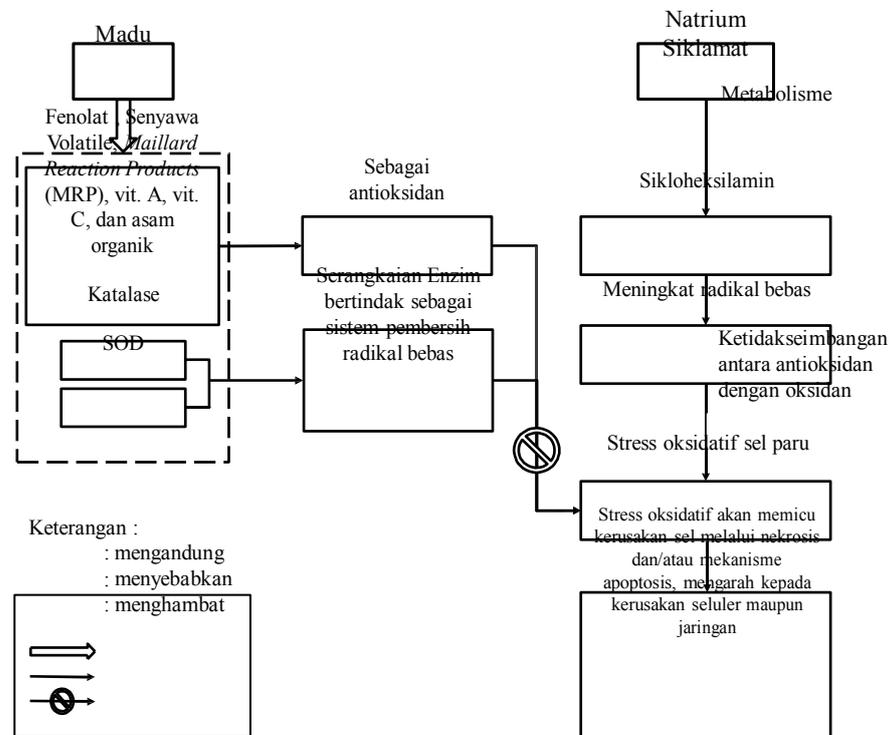
Pada umumnya radikal bebas di dalam paru yang merupakan hasil metabolisme normal sel-sel paru, pada umumnya dapat diatasi oleh antioksidan yang terdapat di dalam paru tersebut. Peningkatan jumlah oksidan di dalam paru melebihi jumlah antioksidan akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif pada sel.²⁹ Stres oksidatif diakibatkan oleh ketidakseimbangan antara radikal bebas (*reactive oxygen* dan *nitrogen species*) serta penurunan produksi maupun ketersediaan antioksidan.³¹ Salah satu oksidan terbanyak yang

menyebabkan stres oksidatif berasal dari kelompok *Reactive Oxydative Species* (ROS).²⁹

ROS adalah kelompok molekul yang mengandung oksigen. Apabila kemampuan untuk menghasilkan ROS berkurang maka akan terjadi disfungsi organ dan penyakit.³⁰ Meskipun radikal bebas oksigen adalah produk sampingan alami dari metabolisme di dalam organisme, mereka menyebabkan kerusakan sel dan kerusakan struktur DNA.³¹ Kerusakan seluler dan jaringan dapat disebabkan oleh meningkatnya kadar ROS dan stres oksidatif yang akan memicu kematian sel melalui apoptosis dan nekrosis.³²

Madu memiliki kandungan antioksidan yang tinggi yaitu senyawa fenolat, enzim *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione peroxidase* (GPx), katalase, senyawa *volatile*, vitamin C dan beta karoten.³ Antioksidan yang paling banyak pada madu adalah polifenol, seperti flavonoid dan asam fenolat. Polifenol bertindak sebagai *radical-scavanger*, *metal ion-chelator* dan *singlet oxygen- quencher* yang dianggap sebagai kontributor utama antioksidan.³³ Sedangkan vitamin dalam madu akan memberikan donor elektronnya pada radikal bebas sehingga radikal bebas tersebut menjadi senyawa yang stabil, lemah dan tidak berbahaya.^{30,34} Dengan kandungan antioksidan tersebut, madu dapat membantu dalam meringankan proses inflamasi, mengurangi hipersekresi mukus, mencegah terjadinya perubahan sel-sel paru dan menurunkan apoptosis sel paru itu sendiri.³

2.5. Kerangka Teori



Gambar 2.4. Kerangka Teori

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Desain penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental dengan *posttest only with control grup design*, yaitu jenis penelitian yang hanya melakukan pengamatan terhadap kelompok kontrol dan perlakuan setelah diberi suatu tindakan.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara dan Laboratorium Patologi di Balai Veteriner Medan.

3.2.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada April 2021 sampai Mei 2021.

3.3. Populasi Penelitian

3.3.1. Populasi Target

Tikus putih jantan galur wistar

3.4. Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

3.4.1. Sampel

Subjek yang menjadi sampel pada penelitian ini adalah seluruh anggota populasi yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak memenuhi kriteria eksklusi dengan menggunakan teknik *purposive sampling*, dimana jumlah sampel dibagi dalam proporsi jumlah yang sama.

3.4.2. Estimasi Besar Sampel

Penentuan besar sampel dilakukan dengan penggunaan rumus Federer:

Keterangan :

$$\boxed{(t-1)(n-1) \geq 15}$$

t = Kelompok perlakuan

n = jumlah sampel untuk 1 kelompok perlakuan

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Besar sampel (N) = t x n

$$= 5 \times 5$$

$$= 25 \text{ ekor tikus}$$

3.4.3. Penentuan Jumlah Sampel Tikus

Dalam penelitian ini penulis menggunakan teknik *purposive sampling*. Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan *posttest only with control grup design*. Subjek pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar. Jumlah tikus yang digunakan sebanyak 25 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok dengan jumlah tikus pada masing-masing kelompok adalah 5 ekor. 5 kelompok tikus tersebut terdiri dari: 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok yang diberi natrium siklamat, 1 kelompok perlakuan positif dengan dosis I (0,3 ml madu yang belum diencerkan), 1 kelompok perlakuan positif dengan dosis II (0,45 ml madu yang belum diencerkan), 1 kelompok perlakuan positif dengan dosis III (0,6 ml madu yang belum diencerkan).

3.5. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

3.5.1. Kriteria Inklusi

1. Tikus wistar jantan dengan berat badan 200-400 gram

2. Usia tikus 3-5 bulan

3.5.2. Kriteria Eksklusi

1. Selama perlakuan tikus putih jantan galur wistar tampak sakit
2. Terlihat gerakan tidak aktif dari biasanya
3. Tikus mati sebelum waktunya

3.6. Prosedur Kerja

Untuk mendapat gambaran secara jelas, jalannya penelitian adalah sebagai berikut

1. Peneliti meminta izin dengan mengurus *ethical clearance*.
2. Penelitian meminta izin permohonan pelaksanaan penelitian yang akan diajukan pada institusi pendidikan Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen.
3. Mengajukan surat izin penelitian pada laboratorium tempat penelitian.
4. Adaptasi hewan dilakukan selama 1 minggu di *animal house*, dimana hewan uji di kelompokkan dalam 5 kelompok dan masing-masing kelompok di letakkan dalam satu kandang.
5. Alat dan bahan

Alat :

- Seperangkat Alat Bedah Minor
- Spuit 1 cc dan 5 cc
- Sarung tangan
- *Tube* organ
- Tabung reaksi 25 ml

Bahan :

- Madu
- Aquades
- Natrium siklamat
- Pakan tikus
- Formalin

6. Penyiapan hewan uji

Tikus berjumlah 25 ekor dikelompokkan menjadi 5 kelompok yang akan diamati selama 14 hari. 5 ekor tikus kelompok kontrol negatif (hanya diberikan pakan dan aquadest selama 14 hari), 5 ekor tikus kelompok yang diberi natrium siklamat pada hari ke 12, 13 dan 14), 5 ekor tikus kelompok perlakuan positif dengan dosis I (0,3ml madu yang belum diencerkan dan diberikan selama 14 hari), 5 ekor tikus kelompok perlakuan perlakuan positif dengan dosis II (0,45 ml madu yang belum diencerkan dan diberikan selama 14 hari), 5 ekor tikus kelompok perlakuan positif dengan dosis III (0,6 ml madu yang belum diencerkan dan diberikan selama 14 hari). Setiap kelompok dipisahkan dalam kandang yang berbeda.

7. Penyiapan dan pemberian madu

Madu yang digunakan pada penelitian ini adalah madu hutan yang dibeli dari Riau dan diencerkan dengan aquades. Pada manusia, konsumsi madu yang optimum untuk mencegah penyakit adalah 1-2 kali perhari 1 sendok makan (15 mL).

Penghitungan dosis madu:

a. Dosis I setara dengan dosis pada manusia yaitu 15 mL.

Dosis pada manusia dikonversikan ke tikus, yaitu $15 \text{ mL} \times 0.018 = 0,23 \text{ mL}/200\text{grBB}$ per hari.

b. Dosis II madu adalah 1,5x dari dosis madu I.

Dosis I adalah $0,3 \text{ mL}/200\text{grBB} \times 1,5 = 0,45 \text{ mL}/200\text{grBB}$ per hari.

c. Dosis III madu adalah 2 x dari dosis madu I

Dosis I adalah $0,3 \text{ mL}/200\text{grBB} \times 2 = 0,6 \text{ mL}/200\text{grBB}$ per hari.

Dosis madu yang telah ditentukan berdasarkan hasil konversi dari manusia ke tikus kemudian diencerkan menggunakan aquadest. Dengan dosis pertama 0,3 ml/200 gram BB tikus, dosis kedua 0,45 ml/200gram BB tikus, dan dosis ketiga 0,6 ml/200gramBB tikus yang kemudian diencerkan menggunakan aquadest. Dimana pengenceran 0,3 mL madu + aquadest = 10 mL, jadi 1 ml larutan mengandung 0,3 ml madu, 1,5 ml larutan mengandung 0,45 ml madu dan 2 ml larutan mengandung 0,6 ml madu.

Madu yang sudah dilarutkan dengan aquadest akan diberikan selama 14 hari berturut-turut. Pemberian madu bertujuan untuk melindungi atau mengurangi kerusakan paru yang diakibatkan oleh natrium siklamat.

8. Penyiapan dan pemberian natrium siklamat

Natrium siklamat yang digunakan pada penelitian ini adalah natrium siklamat yang dibeli dari toko pemanis buatan terdekat. Dosis yang digunakan 231 mg/200gamBB/hari (dosis tertinggi). Kemudian natrium siklamat dilarutkan dengan aquadest, sehingga dalam 1 ml larutan mengandung 231 mg natrium siklamat.

Natrium siklamat dilarutkan dengan aquadest dan diberikan selama 3 hari berturut-turut yaitu pada hari ke-12, 13, dan 14. Pemberian natrium siklamat bertujuan untuk menimbulkan kerusakan pada sel paru tikus tanpa menyebabkan kematian.

9. Cara pengambilan organ tikus

Pada hari ke-15 setelah pemberian madu dan natrium siklamat, tikus akan dibunuh untuk pengambilan organ. Tikus dibunuh secara *euthanasia* dengan cara pemberian zat anestetik secara intravena (Injeksi Ketamin 75mg/kgBB), kemudian dilakukan pembedahan untuk mengambil organ

paru. Organ paru yang diambil dimasukkan ke dalam tube yang berisi formalin 10%, lalu dikirim ke laboratorium histopatologi Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara untuk dijadikan preparat penelitian.

10. Cara pembuatan dan pembacaan preparat

Organ paru tikus dikirim ke laboratorium histopatologi, kemudian organ diolah menjadi preparat dengan menggunakan pewarnaan hematoxilin eosin (HE). Preparat yang telah jadi akan dikirim ke Laboratorium Patologi di Balai Veteriner Medan dan dibacakan hasil interpretasinya oleh ahli histopatologi. Hasil perubahan sel-sel paru (Kerusakan paru ditentukan dari penjumlahan adanya oedema alveolus, destruksi dinding alveoli dan infiltrasi radang) diamati di mikroskop pada perbesaran 400 kali. Perubahan sel-sel paru yang terlihat dihitung dalam seluruh lapang pandang dengan jumlah 100 sel. Rata-rata jumlah kelainan pada paru dihitung pada lima lapang pandang per slide. Jumlah kerusakan dikuantitatifkan berdasarkan metode Hansel dan Barnes.

3.7. Identifikasi Variabel

Variabel independen : Pemberian madu dan natrium siklamat
 Variabel dependen : Kerusakan histologis sel paru tikus jantan galur wistar

3.8. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur
1.	Kerusakan histologis sel paru	Pengukuran kerusakan histologis sel paru sebelum	Mikroskop	Numerik

		dan sesudah	
		mengonsumsi madu dan natrium siklalat dengan memeriksa preparat dari potongan paru	
2.	Madu	Madu merupakan cairan alami yang memiliki rasa manis yang dihasilkan oleh lebah madu dari sari bunga atau bagian lain tanaman atau ekskresi serangga.	- Numerik
3.	Natrium Siklalat	Natrium siklalat merupakan pemanis buatan yang mempunyai rasa manis tanpa ada rasa ikutan yang kurang disenangi atau rasa pahit.	- Numerik

3.9.

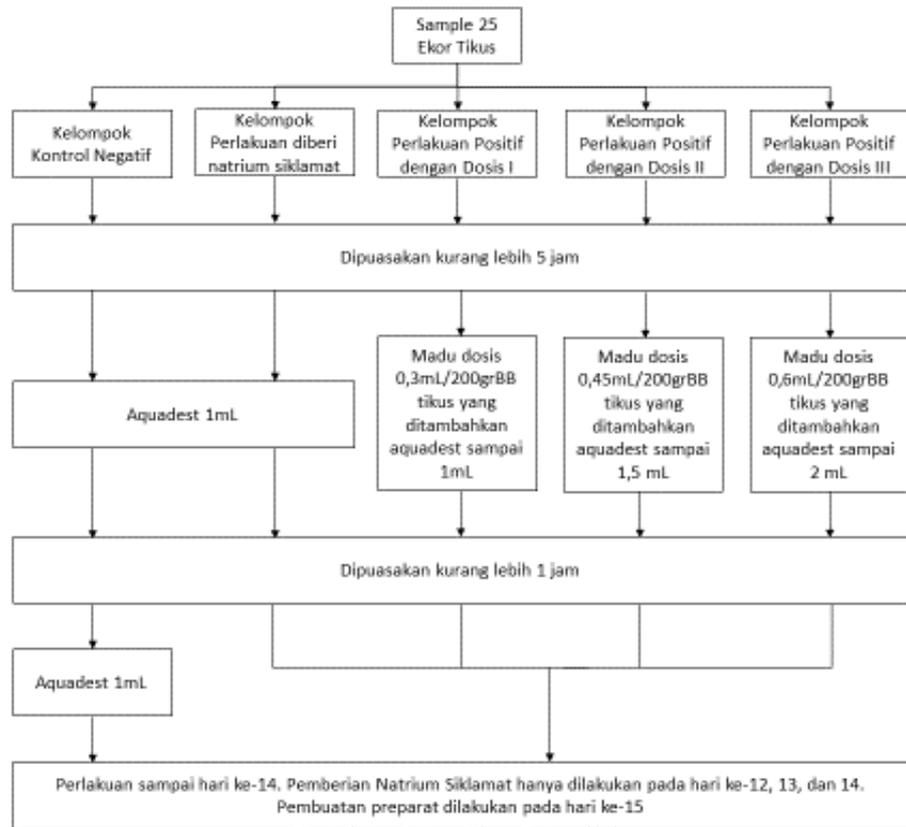
A

n

alisis Data

Analisis data penelitian dilakukan menggunakan perangkat lunak komputer. Analisis bivariat dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian madu sebagai antioksidan terhadap kerusakan histopatologi sel paru tikus putih jantan galur wistar yang dirusak menggunakan natrium siklalat menggunakan uji *one way annova*. Jika data tidak terdistribusi normal maka menggunakan uji Kruskal Wallis.

3.10. Alur Penelitian



Gambar 3.1. Alur Penelitian