

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk menguji efek estrogenik ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. pada berat basah uterus tikus yang diovariectomi. *Dioscorea alata* L. ini dipilih karena memiliki senyawa fitoestrogen yang memiliki efek serupa estrogen dalam tubuh manusia. Senyawa tersebut yang salah satunya adalah diosgenin. Efek estrogenik diosgenin terbukti dapat diubah menjadi progesteron alami ilmiah. Tidak ada enzim dalam tubuh manusia yang akan mengkonversi diosgenin, yang merupakan komponen aktif dari ubi menjadi progesteron. Diosgenin menyediakan sekitar 50 % dari bahan baku untuk pembuatan kortison, progesteron, dan banyak hormon steroid lainnya.

Sebelum dilakukan pembuatan ekstrak umbi *Dioscorea alata* L., dilakukan identifikasi taksonomi umbi *Dioscorea alata* L. di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya kesalahan dalam mengambil obyek uji. Setelah didapatkan umbi *Dioscorea alata* L. yang tepat, umbi *Dioscorea alata* L. disiapkan sebanyak 10 kilogram, dikupas untuk menghilangkan kotoran dan dipotong kecil-kecil kemudian dikeringkan dalam oven 60-70°C hingga kering. Pemetongan umbi *Dioscorea alata* L. ditujukan untuk mempercepat proses pengeringan. Sedangkan pengeringan potongan umbi

Dioscorea alata L. bertujuan untuk mengurangi kadar air agar umbi tidak ditumbuhi jamur. Umbi *Dioscorea alata* L. yang sudah kering dihaluskan dengan *blender* menjadi partikel-partikel kecil atau disebut sebagai simplisia. Penghalusan umbi *Dioscorea alata* L. dengan menggunakan *blender* ditujukan untuk memperluas permukaan simplisia sehingga akan lebih banyak terestrasi dengan sari (Farmakope V). Didapatkan 3 kilogram simplisia yang kemudian dimaserasi berulang kali dalam toples kaca dengan pelarut etanol 70% . Etanol merupakan pelarut polar tetapi pada etanol 70%, etanol menjadi pelarut yang semi polar. Dengan menggunakan pelarut semi polar, diharapkan kandungan dari umbi *Dioscorea alata* L. yang bersifat baik polar maupun non polar akan keluar (saponin, flavonoid, dan 1-feruloylglicerol) (Praniarda, 2013). Pada ekstraksi dengan pelarut etanol memiliki keunggulan yaitu ekstrak yang terbentuk tidak akan mudah ditumbuhi kapang (Farmakope V). Ekstrak etanol disaring dengan kain saring dan ditampung pada toples kaca. Sisa bahan penyaringan direndamlagi dengan etanol sama seperti perendaman yang dilakukan sebelumnya (remaserasi). Setelah remaserasi, bahan disaring lagi dan hasilnya digabung dengan bahan yang sebelumnya sudah disaring. Bahan yang sudah disaring kemudian diuapkan untuk menghilangkan kandungan etanol dalam bahan ekstrak pada suhu 50°C dalam water bath menggunakan *vacum pump evaporator* untuk meningkatkan jumlah zat aktif terlarut yang diinginkan dengan cara mengurangi jumlah pelarutnya (Farmakope V). Dari hasil penguapan tersebut didapatkan ekstrak kental seberat 1000 gram. Maka

didapatkanlah ekstrak kental umbi *Dioscorea alata* L. dengan rendemen 0,33% ($\frac{1000}{3000}$).

Penelitian ini menggunakan tikus *Sprague-Dawley* betina berusia 8 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Pemilihan tikus *Rattus norvegicus* galur *Sprague-Dawley* mempertimbangkan beberapa karakteristik tikus galur tersebut jika dibandingkan hewan uji lainnya dan pada usia tersebut organ reproduksi tikus betina telah berfungsi sempurna. Berat badan awal relatif sama atau homogen antara 148-280 g. Berat badan tikus yang homogen ini diharapkan dapat mengurangi terjadinya bias pada penelitian, sehingga segala perubahan yang terjadi pada tikus hanya disebabkan oleh perlakuan (ovariectomi dan pemberian ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. peroral). Kemudian 39 tikus diadaptasi selama 1 minggu yang bertujuan untuk mempersiapkan tikus secara fisik dan fisiologis terhadap lingkungan baru dan perlakuan yang akan diterimanya nanti. Dengan adanya proses adaptasi, tikus akan menjadi lebih siap terhadap perlakuan dan terhindar dari stress jangka panjang (Institute of Laboratory Animal Research Commission on Life Sciences, 2010 *cit.* Ridwan, 2013). Setelah itu tikus dibagi menjadi 6 kelompok secara *simple random sampling*, yaitu tanpa ovariectomi, ovariectomi, ovariectomi dengan pemberian ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) dosis 116 mg/kgBB, ovariectomi dengan pemberian ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) dosis 232 mg/kgBB, ovariectomi dengan pemberian ekstrak umbi uwi ungu

(*Dioscorea alata* L.) dosis 463 mg/kgBB, dan ovariektomi dengan pemberian Estradiol 252µg/hari.

Ovariektomi dilakukan pada 34 ekor tikus di Ruang Hewan Uji Laboratorium Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Tujuan dari ovariektomi adalah membuat tikus tidak lagi memiliki ovarium yang merupakan penghasil utama hormon estrogen yang menjaga siklus kesuburan tikus betina. Sehingga dengan tidak adanya estrogen yang dihasilkan didalam tubuh tikus, siklus kesuburan tidak akan terjaga dan tikus jatuh dalam keadaan menopause (Nurrochmad,2010).Mula-mula tikus diinjeksiketamin dengan dosis sesuai BB hewan uji. Setelah tikus teranastesi, di bagian perut dicukur dengan silet untuk mempermudah proses pembedahan, lalu proses ovariektomi dimulai dengan membuat sayatan pada bagian perut dengan menggunakan gunting bedah lalu dicari ovariumnya kemudian diovariektomi. Luka bedah diolesi dengan povidon iodine untuk mencegah infeksi pasca pembedahan. Sayatan kemudian dijahit dengan menggunakan benang larut kulit (*catgut*). Tikus yang telah diovariektomi diberi injeksi Procain Penicillin yang bertujuan untuk mencegah infeksi. Selanjutnya dipelihara selama 3 minggu untuk mendapatkan efek menopause. Sedangkan 5 ekor tikus lainnya tidak dilakukan proses ovariektomi.

Setelah 21 hari, hewan uji diberi perlakuan berupa pemberian ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) dengan teknik penyondean (pemberian secara oral) selama 30 hari. Pembagian kelompok sebagai berikut :

1. Kelompok (K0) = kontrol normal (tanpa ovariektomi) sebanyak 5 ekor

2. Kelompok (K-) = kontrol negatif (ovariektomi) sebanyak 8 ekor
3. Kelompok (K+) = kontrol positif estradiol dengan dosis 252 $\mu\text{G}/\text{hari}$ (ovariektomi) sebanyak 9 ekor
4. Kelompok (P1) = pemberian ekstrak *Dioscorea alata* L. dengan dosis 116 mg/kgBB (ovariektomi) sebanyak 6 ekor
5. Kelompok (P2) = pemberian ekstrak *Dioscorea alata* L. dengan dosis 232 mg/kgBB (ovariektomi) sebanyak 5 ekor
6. Kelompok (P3) = pemberian ekstrak *Dioscorea alata* L. dengan dosis 463 mg/kgBB (ovariektomi) sebanyak 6 ekor

Tabel 3. Jumlah Sampel Penelitian

No	Kelompok	Jumlah
1	Kontrol Negatif	5
2	Perlakuan I = Ovariektomi	8
3	Perlakuan II = Ovariektomi + Ekstrak <i>D.alata</i> 116 mg/kgBB	6
4	Perlakuan III = Ovariektomi + Ekstrak <i>D.alata</i> 232 mg/kgBB	5
5	Perlakuan IV = Ovariektomi + Ekstrak <i>D.alata</i> 463 mg/kgBB	6
6	Kontrol Positif = Ovariektomi + estradiol 252 $\mu\text{g}/\text{hari}$	9
	Total	39

Pengelompokan sampel penelitian ini, merujuk pada rumus jumlah sampel minimal pada penelitian menggunakan hewan uji, yaitu rumus Federer. Setelah dihitung menggunakan rumus Federer, jumlah sampel minimal yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 ekor tikus yang merupakan jumlah variasi minimal dalam penelitian. Semakin besar *range* variasi jumlah sampel tiap kelompok akan menciptakan penelitian yang representatif. Namun, penentuan besarnya *range* variasi jumlah sampel tiap

kelompok tetap harus memperhatikan etika penelitian hewan uji. Sehingga berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini menggunakan jumlah sampel yang berbeda untuk tiap kelompoknya, dengan 5-9 ekor tikus pada tiap kelompoknya.

Selama perlakuan, tikus ditimbang setiap minggunya untuk mengetahui perkembangan berat badan. Secara umum berat badan tikus mengalami laju perkembangan berat badan yang berbeda-beda.

Perhitungan berat basah uterus dilakukan setelah semua kelompok diberi perlakuan selama 30 hari. Pada hari ke-31, tikus dikorbankan kemudian dinding abdomen dibuka dengan alat bedah minor dan dilakukan pengambilan uterus. Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap berat basah uterus menggunakan timbangan digital (ketelitian hingga 0,001 gram), lalu dicatat hasilnya.

Rata-rata berat basah uterus

Tabel 4. Rata-Rata Berat Basah Uterus

Kelompok perlakuan	Rata-rata berat basah uterus (g)
K0	0,57±0,06
K-	1,29±0,30
P1	1,01±0,30
P2	1,25±0,34
P3	1,22±0,33
K+	1,13±0,33

Keterangan :

K0 : kontrol normal tanpa perlakuan

K- : kontrol negatif (ovariektomi)

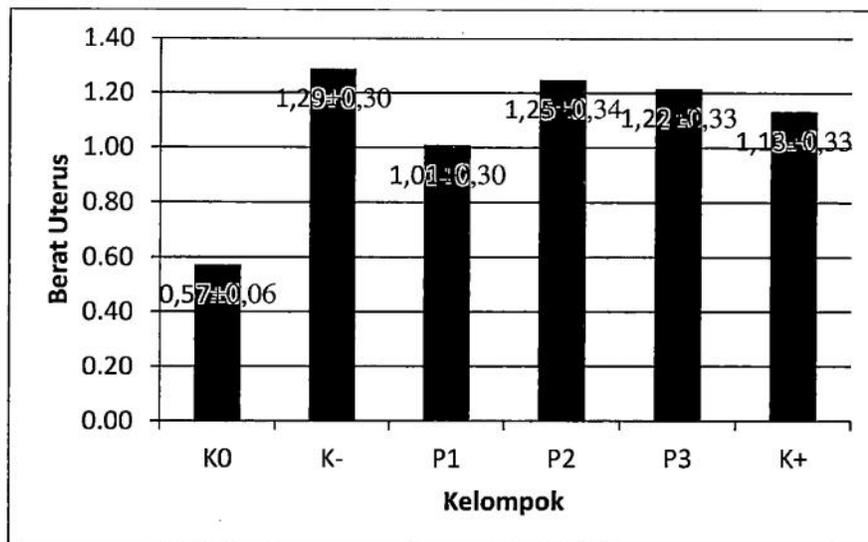
K+ : kontrol positif (ovariektomi + estradiol 252µg/hari)

P1 : perlakuan 1 (ovariektomi + ekstrak *D. alata* 116 mg/kgBB)

P2 : perlakuan 2 (ovariektomi + ekstrak *D. alata* 232 mg/kgBB)

P3 : perlakuan 3 (ovariektomi + ekstrak *D. alata* 463 mg/kgBB)

Berdasarkan tabel 5, dapat diketahui bahwa pada pemberian ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) dapat menurunkan rata-rata berat basah uterus tikus ovariektomi jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Nilai terendah ditunjukkan pada kelompok K0 yaitu kontrol normal tanpa ovariektomi dan pemberian terapi yaitu $0,57 \pm 0,06$ gram. Sedangkan rata-rata berat basah uterus tertinggi ditunjukkan pada kelompok kontrol negatif yang diovariektomi, yaitu $1,29 \pm 0,30$ gram.



Gambar 5. Grafik Rata-Rata Berat Basah Uterus

Keterangan :

K0 : kontrol normal tanpa perlakuan

K- : kontrol negatif (ovariektomi)

K+ : kontrol positif (ovariektomi + estradiol 252 µg/hari)

P1 : perlakuan 1 (ovariektomi + ekstrak *D. alata* 116 mg/kgBB)

P2 : perlakuan 2 (ovariektomi + ekstrak *D. alata* 232 mg/kgBB)

P3 : perlakuan 3 (ovariektomi + ekstrak *D. alata* 463 mg/kgBB)

Terjadi penurunan berat basah uterus pada kelompok K+, P1, P2 dan P3 dengan pemberian estradiol 252 µg/hari, ekstrak *D. alata* 116 mg/kgBB,

232mg/kgBB dan 463mg/kgBB selama 30 hari bila dibandingkan dengan kelompok negatif.

Uji statistik pada penelitian ini diawali dengan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* yang menyatakan bahwa persebaran data normal yaitu $p = 0,129$ ($p > 0,05$). Sedangkan uji statistik *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% ($<0,05$), menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang signifikan pada berat basah uterus antara lima kelompok perlakuan yaitu $p = 0,004$ ($p < 0,05$).

Setelah diketahui adanya perbedaan yang signifikan, maka analisis dilanjutkan dengan uji statistik menggunakan *Post Hoc Tukey HSDtest* untuk memperoleh hasil *Multiple Comparison test*. Metode *Post Hoc* ini digunakan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA (lihat lampiran). Berikut hasil uji *Post Hoc Tukey* :

Tabel 5. Uji Perbandingan Berat Basah Uterus Antar Kelompok

	K0	K-	P1	P2	P3	K+
K0	-	0,002*	0,178	0,012*	0,013*	0,021*
K-	0,002*	-	0,519	1,000	0,998	0,890
P1	0,178	0,519	-	0,765	0,830	0,967
P2	0,012*	1,000	0,765	-	1,000	0,981
P3	0,013*	0,998	0,830	1,000	-	0,994
K+	0,021*	0,890	0,967	0,981	0,994	-

Keterangan :

K0 : kontrol normal tanpa perlakuan

K- : kontrol negatif (ovariektomi)

K+ : kontrol positif (ovariektomi + estradiol 252µg/hari)

P1 : perlakuan 1 (ovariektomi + ekstrak *D. alata* 116 mg/kgBB)

P2 : perlakuan 2 (ovariektomi + ekstrak *D. alata* 232 mg/kgBB)

P3 : perlakuan 3 (ovariektomi + ekstrak *D. alata* 463 mg/kgBB)

 $p^* < 0,05$ = terdapat perbedaan yang bermakna

 $p > 0,05$ = tidak terdapat perbedaan yang bermakna

1. Kelompok K0 berbeda signifikan dengan kelompok K-, P2, P3 dan K+.
2. Kelompok K0 tidak berbeda signifikan dengan kelompok P1
3. Kelompok perlakuan K- berbeda signifikan dengan kelompok K0
4. Kelompok perlakuan K- tidak berbeda signifikan dengan kelompok P1, P2, P3 dan K+
5. Kelompok perlakuan P1 tidak ada berbeda signifikan dengan kelompok lainnya.
6. Kelompok perlakuan P2 berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan K0
7. Kelompok perlakuan P2 tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan K-, P1, P3 dan K+
8. Kelompok perlakuan P3 berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan K0
9. Kelompok perlakuan P3 tidak berbeda signifikan dengan kelima kelompok perlakuan K-, P1, P2 dan P3
10. Kelompok perlakuan K+ berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan K0
11. Kelompok perlakuan K+ tidak berbeda signifikan dengan kelompok K-, P1, P2, dan P3

B. Pembahasan

1. Hewan Coba

Pemilihan sampel hewan coba tikus pada awal penelitian harus sesuai dengan kriteria yang telah ditetapkan dan dilakukan dengan teliti untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Jenis tikus yang digunakan adalah tikus betina jenis Sprague Dawley dengan umur berkisar 8 minggu, sehat ditandai dengan nafsu makan baik dan gerak aktif. Berat badan awal relatif sama atau homogen antara 151-280 g, yang ditunjukkan dengan hasil Test of Homogeneity of Variances $p = 0,145$ ($p > 0,05$). Dengan homogenitas ini diharapkan dapat mengurangi terjadinya bias pada penelitian.

Tabel 6. Karakteristik Sampel

Variabel	Karakteristik
Jenis tikus	Sprague-Dawley
Usia	8 minggu
Jenis Kelamin	Betina
Rata-rata berat badan (mean \pm SD)	194,79 \pm 29,45

2. Pengaruh Ekstrak Umbi Uwi Ungu (*Dioscorea alata* L.) terhadap Berat Basah Uterus

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) terhadap berat basah uterus pada tikus tikus putih betina yang diovariectomi (model menopause). Pemberian ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) ini diperkirakan akan menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap perubahan berat

basah uterus, namun justru berkebalikan dengan hipotesis yang peneliti perkirakan.

Secara teori, keadaan menopause adalah keadaan dimana berhentinya menstruasi secara permanen akibat tidak bekerjanya folikel ovarium, sehingga ovarium tidak lagi menghasilkan hormon estrogen dan progesteron yang dapat memelihara uterus dalam siklusnya dan menyebabkan atrofi uterus (beratnya berkurang dan mengecil).

Berdasarkan hal tersebut peneliti ingin mencoba memberikan ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) yang diharapkan dapat memberikan perubahan terhadap berat uterus pada tikus ovariektomi (sebagai model menopause), mengingat bahwa terdapat kandungan diosgenin dalam ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) yang merupakan fitoestrogen yang menyerupai hormon estrogen dalam tubuh dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen dalam tubuh, sehingga dapat dijadikan sebagai pilihan agen terapi sulih hormon dalam meningkatkan berat uterus pada keadaan menopause.

Pada penelitian ini juga terdapat kelompok perlakuan pemberian estradiol (Progynova 2 mg) sebagai kontrol positif, karena estradiol telah terbukti dapat berikatan dengan reseptor estrogen dan dapat menggantikan aktifitas hormon estrogen dalam memelihara aktivitas uterus yang berdampak pada peningkatan berat uterus pada keadaan menopause.

Dari hasil penelitian yang dilakukan, didapatkan hasil berat basah uterus kelompok kontrol negatif (K-) adalah yang paling tinggi. Padahal

seharusnya hasil yang diharapkan pada kelompok kontrol negatif (K-) adalah berat uterus yang lebih rendah karena tidak adanya hormon estrogen yang dihasilkan ovarium yang menyebabkan atrofi uterus jika dibandingkan berat basah uterus tikus pada kelompok kontrol normal (K0). Hasil tersebut diperkirakan karena adanya inflamasi akibat prosedur ovariectomi yang telah dilakukan atau akibat ketidaksterilan alat saat pembedahan tikus (ovariectomi) bukan karena faktor fisiologis hormonal.

Pada kelompok perlakuan pemberian estradiol (kelompok K+) didapatkan hasil berupa penurunan terhadap berat basah uterus jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan tikus ovariectomi (K-). Seharusnya jika memang yang diharapkan dari estradiol adalah efek estrogen, maka hasil berat basah uterus yang diharapkan pada kelompok yang diberi estradiol adalah lebih tinggi dari kelompok tikus ovariectomi (K-)

Sedangkan pemberian ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) dengan berbagai macam tingkatan dosis pada penelitian ini (kelompok P1, P2 dan P3) tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan terhadap berat basah uterus jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ovariectomi (K-). Dari hasil analisis statistik menunjukkan berat basah uterus tikus ovariectomi pada perlakuan P1, P2, dan P3 mengalami penurunan. Padahal secara teoritis seharusnya semakin tinggi dosis yang diberikan maka semakin baik dalam meningkatkan berat basah uterus pada

tikus ovariektomi. Hal ini bisa jadi disebabkan karena dosis yang diberikan masih kurang tepat.

Namun demikian, peneliti lebih cenderung berasumsi bahwa penyebab ketidaksesuaian hasil penelitian ini mengarah ke timbulnya inflamasi karena prosedur ovariektomi atau ketidaksterilan alat bedah. Sehingga pembengkakan yang terjadi pada kelompok perlakuan tersebut menyebabkan peningkatan berat basah uterus. Meski demikian, perkiraan ini masih bersifat sementara dan membutuhkan penelitian lebih lanjut, karena penurunan berat uterus ini pun tidak signifikan jika dibandingkan dengan kontrol negatif.

C. Kesulitan Penelitian

Dalam melakukan penelitian ini, keterbatasan yang dirasa oleh peneliti adalah proses tindakan ovariektomi sebagai model menopause. Peneliti merasa kesulitan dalam penentuan ovarium, sehingga meminta bantuan kepada pihak yang lebih kompeten untuk melakukan proses ovariektomi. Karena terbatasnya jumlah personil yang dapat memberikan bantuan ovariektomi secara kompeten, maka proses ovariektomi memakan waktu yang lama. Selain itu, dalam proses ovariektomi peneliti tidak memotong ovarium hewan uji namun menggunakan benang untuk mengikat uterusnya. Hal ini dilakukan untuk menghindari efek perdarahan yang berlebihan yang dapat mengakibatkan matinya hewan uji. Sehingga dengan keterbatasan

dalam proses ovariektomi diperkirakan menimbulkan efek inflamasi pada hewan uji yang diberi perlakuan.