

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *eksperimental in vivo* dengan desain *posttest only control group design*.

B. Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah tikus betina *Sprague-Dawley*, umur 8 minggu, berat badan 148-280 g yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Jumlah kelompok subyek pada penelitian ini disesuaikan dengan perlakuan yang akan diberikan yaitu 6 kelompok. Besar sampel untuk masing-masing kelompok dapat dicari dengan rumus Federer (1963) dalam Monteiro (2013), yaitu :

$(n-1)(t-1) \geq 15 \rightarrow t = \text{jumlah kelompok dan } n = \text{jumlah sampel}$

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

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4 \text{ ekor}$$

Dari rumus tersebut diperoleh jumlah hewan coba untuk masing-masing

Perlakuan adalah lebih besar sama dengan 4 ekor. Pada penelitian ini yang akan menjadi subyek penelitian adalah 39 ekor tikus yang terbagi menjadi 6 kelompok yang berbeda perlakuan.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan LPP Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dalam waktu 4 bulan.

Tabel 2. *Timeline Kegiatan*

No.	Jenis Kegiatan	Bulan I				Bulan II				Bulan III				Bulan IV			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Persiapan alat dan bahan	■															
2	Pembuatan & standarisasi ekstrak biji <i>C. moschata</i>		■	■													
3	Aklimatisasi & ovariektomi tikus				■												
4	Pemeliharaan tikus sampai timbul efek ovariektomi					■	■	■	■								
5	Pemberian perlakuan penelitian									■	■	■	■				
6	Pemeriksaan berat basah uterus													■			
7	Analisis data														■	■	
8	Pembuatan laporan																■

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata L.*)
2. Variabel tergantung : ukuran berat uterus
3. Variabel terkontrol :

- a. Subyek penelitian : Tikus putih galur *Sprague-Dawley*, umur 8 minggu, berat badan 148-280g
- b. Cara pemeliharaan hewan uji : dilakukan aklimatisasi, dipelihara dalam kondisi kandang, pakan minum dan pencahayaan yang sama.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol umbi *Dioscorea alata L.* diperoleh dengan cara umbi *Dioscorea alata* dikeringkan, dihaluskan dan diekstraksi dengan penyari etanol 70% sehingga terbentuk ekstrak etanol umbi *Dioscorea alata*. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dan pemberian ekstrak dilakukan peroral dengan dosis 116mg/kgBB, 232mg/kgBB dan 463mg/kgBB dengan alat bantu sonde.
2. Efek estrogenik adalah perubahan fisiologis dan struktur yang terjadi karena terpapar bahan yang bersifat estrogenik. Efek ini bisa dilihat pada organ-organ yang menjadi organ target estrogen salah satunya adalah uterus. Parameter yang akan dilihat pada penelitian ini adalah berat basah uterus.
3. Berat basah uterus merupakan bobot dari uterus yang diukur setelah tikus dikorbankan dan diambil uterusnya. Setelah diambil, uterus langsung ditimbang dalam keadaan basah dan tidak perlu dikeringkan terlebih dahulu.
4. Tikus Sprague-Dawley yang diovariectomi adalah tikus *Rattus norvegicus*, galur Sprague-Dawley merupakan tikus albino serbaguna untuk digunakan secara ekstensif dalam riset medis. Tikus Sprague-Dawley dilakukan adaptasi selama 1 minggu dan ditimbang berat badannya. Kemudian 34

ekor tikus dilakukan ovariektomi dan 5 sisanya tidak dilakukan ovariektomi. Tikus Sprague-Dawley ovariektomi diberi 2 perlakuan yaitu pemberian estradiol dengan dosis 252 μ g/hari peroral dan pemberian ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. dengan masing-masing dosis 116 mg/kgBB, 232mg/kgBB dan 463mg/kgBB peroral. Pemberian intervensi tersebut dilakukan selama 30 hari dan kemudian dilakukan pembedahan dan diambil uterusnya.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat pembuat ekstrak uji : timbangan, blender kering, alat-alat gelas (erlenmeyer, gelas ukur, gelas beker, corong), homogenizer Heidolph, rotary evaporator Heidolph.
2. Alat perlakuan hewan uji : kandang hewan uji, timbangan hewan, timbangan analitik, sonde lambung, alat gelas, peralatan bedah, mikroskop dilengkapi kamera Olympus.
3. Alat pembedah tikus
4. Alat pembuat preparat histopatologi : oven, mikrotom, staining jar/bejana pereaksi warna, hot plate, lampu spiritus spatula, kuas pipet tetes.
5. Tikus putih galur Sprague-Dawley, umur 8 minggu, berat badan 148-280 gram diperoleh dari UPHP (Unit Pengelolaan Hewan Percobaan) UGM, pakan dan minum.
6. Umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) yang diperoleh dari daerah Sumber Rahayu, Moyudan, Sleman.

7. Ekstrak etanol umbi *Dioscorea alata* L. diperoleh dari umbi uwi ungu yang diiris tipis, dikeringkan, dihaluskan dan kemudian diekstraksi dengan cairan penyari etanol 70%. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dan dibuat di Laboratorium Biomedik FKIK UMY.

G. Tahap Penelitian

1. Tahap Persiapan

Tahap persiapan dilakukan dengan mengurus izin melaksanakan penelitian di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan LPP Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Umbi Uwi Ungu (*Dioscorea alata* L.)

- 1) Pembuatan Ekstrak Umbi Uwi Ungu (*Dioscorea alata* L.)
- 2) Identifikasi tanaman

Umbi uwi ungu (*Dioscorea alata*) yang digunakan dalam penelitian ini dideterminasi di Taksonomi Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada.

3) Pembuatan ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.)

Serbuk biji diekstraksi menggunakan etanol 70 % dengan metode maserasi sesuai Farmakope Indonesia edisi III. Ekstrak diuapkan diatas penangas air untuk menghilangkan cairan penyari (etanolik) hingga diperoleh ekstrak kental.

4) Standarisasi ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.)

Standarisasi terhadap ekstrak dilakukan dengan cara menganalisa kandungan kimia ekstrak dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan kromatografi Gas dan spektroskopi massa (GC-MS). KLT dilakukan dengan berbagai sistem untuk mengamati adanya golongan senyawa, yakni flavonoid, terpenoid, saponin dan alkaloid.

b. Perlakuan terhadap Tikus putih galur Spraque-Dawley betina

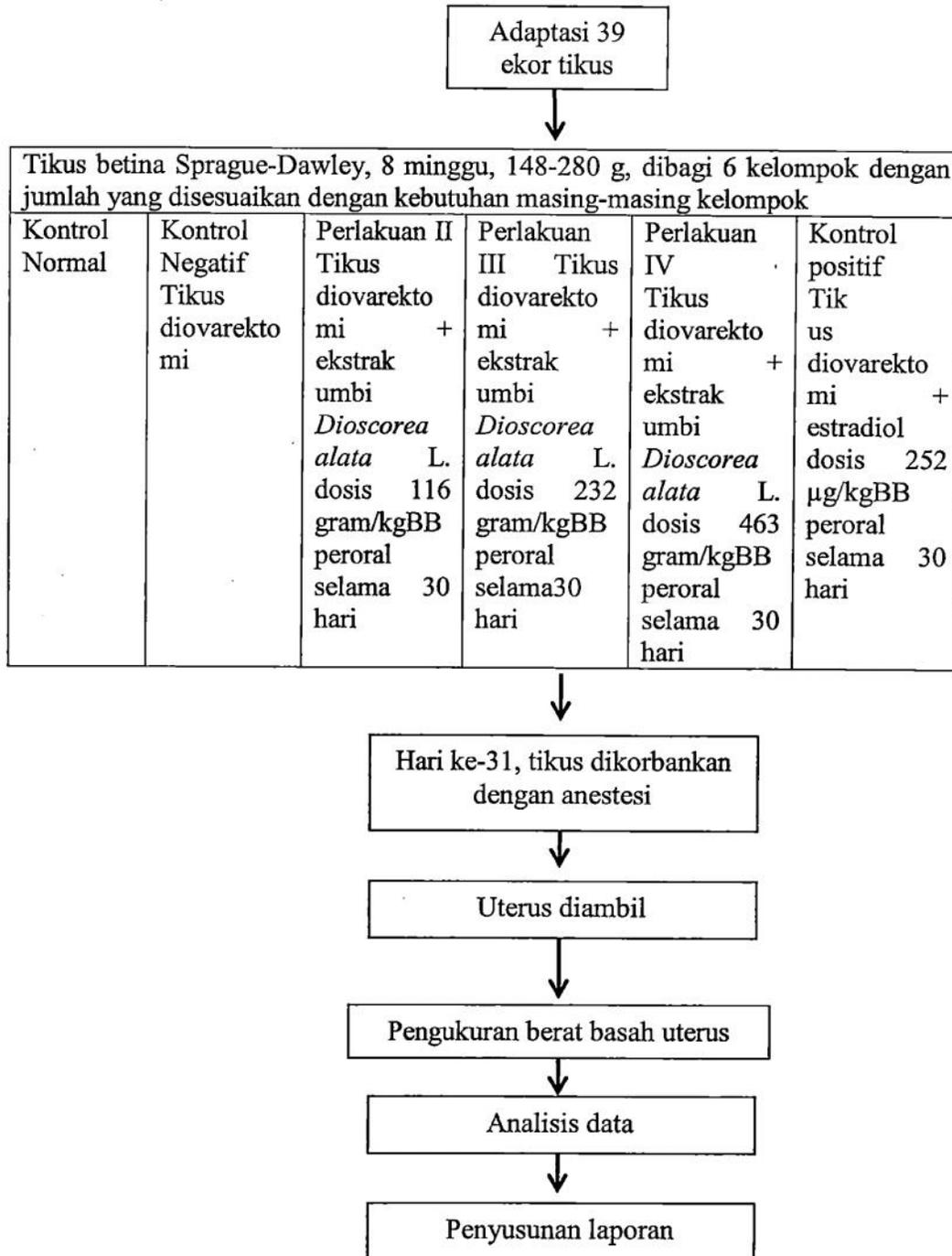
- 1) Tikus putih galur Spraque-Dawley betina diaklimatisasi selama 1 minggu kemudian ditimbang Pada hari ke-7, 34 ekor tikus diantaranya dilakukan ovariektomi bilateral dengan anestesi ketamin 1,8-2 mg/kg BB secara injeksi IM . Selanjutnya dilakukan irisan pada punggung 2cm dicaudal costa 13, disebelah lateral vertebra 1-1,5 cm (Rosa, tt). Ovarium tampak seperti granul-granul, dilakukan pemotongan dan atasi perdarahan yang terjadi. Setelah tindakan diberi injeksi Procain Penicillin untuk mencegah infeksi. Selanjutnya dipelihara selama 4 minggu untuk mendapatkan efek menopause.
- 2) Tikus putih galur Spraque-Dawley betina dibagi menjadi 6 kelompok yaitu:
 - a) Kelompok pertama tanpa diberi perlakuan apapun sebagai kontrol normal
 - b) Kelompok kedua tikus diovariektomi tanpa perlakuan sebagai kontrol negatif

- c) Kelompok perlakuan (P1) diberi ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) peroral dengan dosis 116mg/kgBB selama 30 hari berturut-turut.
 - d) Kelompok perlakuan (P2) diberi ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) dengan dosis 232mg/kgBB selama 30 hari berturut-turut.
 - e) Kelompok perlakuan diberi ekstrak umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) dengan dosis 463mg/kgBB selama 30 hari berturut-turut.
 - f) Kelompok kontrol positif dengan pemberian Estradiol peroral 252µg/hari selama 30 hari berturut-turut.
- c. Pemeriksaan berat uterus dilakukan dengan cara tikus diletakan di toples yang berisi kloroform sampai tikus mengalami kematian. Tikus diletakkan terlentang pada gabus yang dilapisi aluminium foil. Selanjutnya dinding abdomen dibuka dengan gunting steril dan dilakukan pengambilan uterus. Dilakukan pengukuran terhadap berat basah uterus.

3. Tahap penyelesaian

Dilakukan pengolahan dan analisis data setelah data terkumpul secara lengkap.

H. Prosedur Penelitian



Gambar 4. Skema Alur Penelitian

I. Analisis Data

Data pada penelitian ini akan dianalisis menggunakan aplikasi SPSS 15. Uji normalitas yang digunakan adalah *Shapiro-Wilk* karena sampel yang digunakan pada penelitian ini kurang dari 50. Jika persebaran data normal, maka data dianalisis dengan *one way ANOVA* karena jenis hipotesis pada penelitian ini adalah komparatif tidak berpasangan dengan kelompok sampel >2 . Apabila terdapat perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk mengetahui letak perbedaan masing-masing kelompok. Adapun jika data memiliki persebaran tidak normal, maka analisis data yang digunakan adalah *Kruskall Wallis*.

J. Etika Penelitian

Karya Tulis Ilmiah ini telah mendapatkan persetujuan *ethnical clearence* dari Komisi Etik Penelitian FKIK UMY tentang penggunaan hewan uji sebagai subjek penelitian.