

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

##### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain *post test only control group design* secara in-vivo yang menggunakan hewan uji sebagai subjek penelitian.

##### **B. Tempat dan Waktu**

Proses pembuatan ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* Durch.) dan ovariectomi tikus putih betina Sprague dawley dilakukan di laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY. Determinasi tanaman (*Cucurbita moschata* Durch.) dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM. Pemeriksaan kadar kalsium dilaksanakan di LPPT Universitas Gadjah Mada. Penelitian ini dilakukan selama 3 bulan.

##### **C. Subjek Penelitian**

Pada penelitian ini, jumlah total subjek yang digunakan adalah 30 ekor tikus betina Sprague dawley usia 3 bulan dengan berat badan 130-280 gram. Sampel yang digunakan adalah tulang femur, tibia dan fibula. Pengambilan sampel dilakukan untuk mengukur kadar kalsium dalam tulang tikus.

## D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

### 1. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : Dosis ekstrak etanol  
*Cucurbita moschata* (ECM) yaitu: 100; 200; dan 400 mg/kgBB/hari.
- b. Variabel terikat : Kadar kalsium.
- c. Variabel kontrol : Subjek penelitian adalah tikus putih betina Sprague dawley, yang dipelihara dalam kondisi kandang, pakan dan pemeliharaan yang sama.

### 2. Definisi Operasional

- a. Ekstrak adalah ekstrak *C.moschata* (ECM) yang diperoleh dari proses maserasi dengan etanol 70%.
- b. Kalsium adalah kadar kalsium tulang femur, tibia dan fibula tikus yang diukur menggunakan SSA (Spektrofotometri Serapan Atom).

## E. Instrumen Penelitian

### 1. Alat dan Bahan

#### a. Alat :

##### 1) Pembuatan ekstrak :

Mortir dan stamper, oven (Memmert), blender (Miyako), ayakan, timbangan analitik (Mettler toledo AL204), tabung maserasi dan gelas ukur (IWAKI Pyrex®), pengaduk, wadah penampung maserat, kain penyaring, penangas air (Memmert), wadah penampung ekstrak.

2) Perlakuan pada hewan uji :

Sprit injeksi, seperangkat alat bedah tikus, sonde *oral*, kandang tikus, timbangan hewan (Ohaus), tempat minum dan tempat pakan tikus, sarung tangan, alat-alat gelas Erlenmeyer dan gelas ukur (IWAKI Pyrex®) dan Spektrofotometri Serapan Atom (Analitik Jena ContraAA).

b. Bahan :

1) Pembuatan ekstrak :

Biji labu kuning, alkohol 70% (Arindo Pratama).

2) Perlakuan pada hewan uji :

Pakan standar AD2, aquades, Sanpicillin injeksi (Sanbe), Ketamin injeksi 100 mg/ml (Guardian pharmatama), *sterillized water for injection* (Otsuka), CMC-Na 0,5% (Arindo Pratama), Progynova (Bayer), Povidon iodine (One Med), larutan HNO<sub>3</sub> (Merck), larutan HClO<sub>4</sub> (Merck), dan CaCO<sub>3</sub> (Merck).

## F. Prosedur Penelitian

### 1. Pembuatan Ekstrak

Biji labu kuning dibersihkan dengan cara dicuci pada air yang mengalir kemudian disortasi. Biji dengan kualitas baik yang sudah disortasi lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C. Biji labu kuning yang sudah kering kemudian ditumbuk untuk mempermudah halusanya biji, setelah itu biji labu kuning diblender dan diayak. Serbuk biji labu kuning kemudian ditimbang.

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan mengambil 2 kg serbuk biji labu kuning kemudian dimasukkan ke dalam wadah maserasi, lalu ditambahkan alkohol 70% dan diaduk, didiamkan selama 6 hari (maserasi). Setelah itu saring dengan menggunakan kain penyaring, lalu diuapkan di atas penangas air hingga diperoleh ekstrak kental.

## 2. Persiapan dan Pengelompokkan Hewan Uji

Sebanyak 30 ekor tikus putih dibagi menjadi 6 kelompok. Kelompok normal (KN), kelompok negatif ovariektomi (K.OVX), kelompok positif estradiol (K.EST), kelompok ekstrak etanol dosis 100 mg/kgBB (ECM 100), kelompok ekstrak etanol dosis 200 mg/kgBB (ECM 200), dan kelompok ekstrak etanol dosis 400 mg/kgBB (ECM 400).

## 3. Perlakuan pada Hewan Uji

Perlakuan ovariektomi pada hewan uji tikus betina Sprague dawley yaitu diinjeksikan melalui jalur intramuskular dengan antibiotik Sanpicillin® dosis sesuai berat badan hewan uji sebagai profilaksis, kemudian diberi anastesi Ketamin injeksi dengan dosis sesuai berat badan hewan uji. Setelah tikus teranastesi, di bagian perut dicukur untuk mempermudah proses pembedahan, selanjutnya tikus diovariektomi. Sebelum luka ditutup dengan cara menjahit, luka bedah diolesi dengan Povidon iodine untuk mencegah infeksi pasca pembedahan.

Pada hari ke-21 setelah ovariektomi, hewan uji diberi estradiol atau ECM yang dilarutkan dalam CMC-Na 5% selama 30 hari dengan teknik penyondean (pemberian secara *oral*).

#### 4. Pengukuran Kadar Kalsium Tulang Tikus

Pada hari ke-31 pasca pemberian estradiol atau ECM, tikus dikorbankan dan diambil tulang femur, tibia dan fibula untuk diukur kadar kalsium dengan preparasi destruksi basah menggunakan Spektrofotometri Serapan Atom (SSA).

Preparasi sampel dilakukan setelah tikus dikorbankan dengan teknik dislokasi kemudian diambil tulang paha belakang bagian kanan. Tulang femur, tibia dan fibula yang akan dianalisis dibersihkan dari jaringan lunak dan lemak yang menempel lalu dikeringkan.

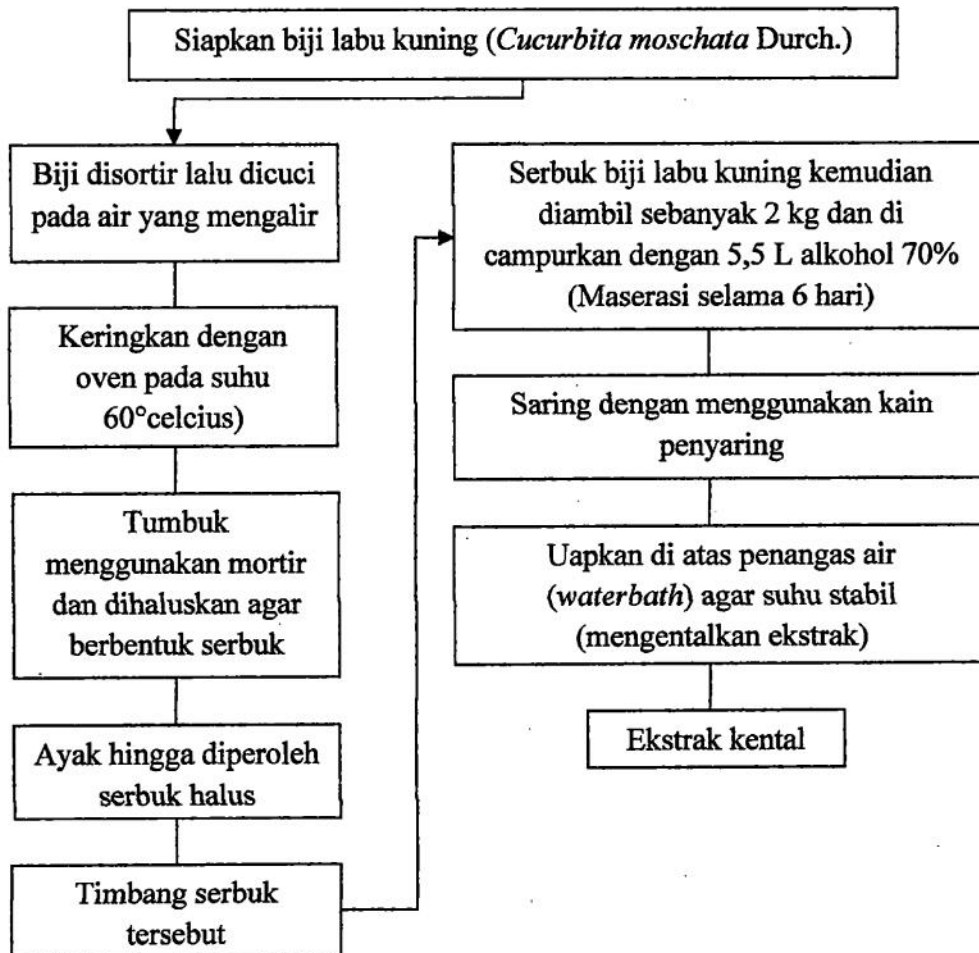
Tulang ditimbang dalam wadah Erlenmeyer, lalu ditambahkan 15 ml  $\text{HNO}_3$  sedikit demi sedikit melalui dinding Erlenmeyer dan dilakukan hal yang sama pada 3 ml  $\text{HClO}_4$ . Setelah itu didestruksi di *plate* pemanas hingga larut dan jernih, destruksi dilakukan hingga sampel tersisa  $\pm 3$  ml. Kemudian ditambahkan 25 ml air suling, disaring di labu 100 ml lalu ditambahkan lagi air suling hingga tanda tera. Sampel hasil destruksi dibaca absorbansinya dengan Spektrofotometri Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 422,7 nm. Hasil pembacaan lalu dibandingkan dengan kurva standar sehingga diperoleh kadar kalsium dalam satuan mg/dl atau ppm.

Kurva standar merupakan hasil pengukuran absorbansi dari beberapa seri pengenceran larutan standar kalsium. Konsentrasi kalsium karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) yang digunakan sebagai larutan standar adalah 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1; 2; 3; 4; dan 5 mg/L. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar

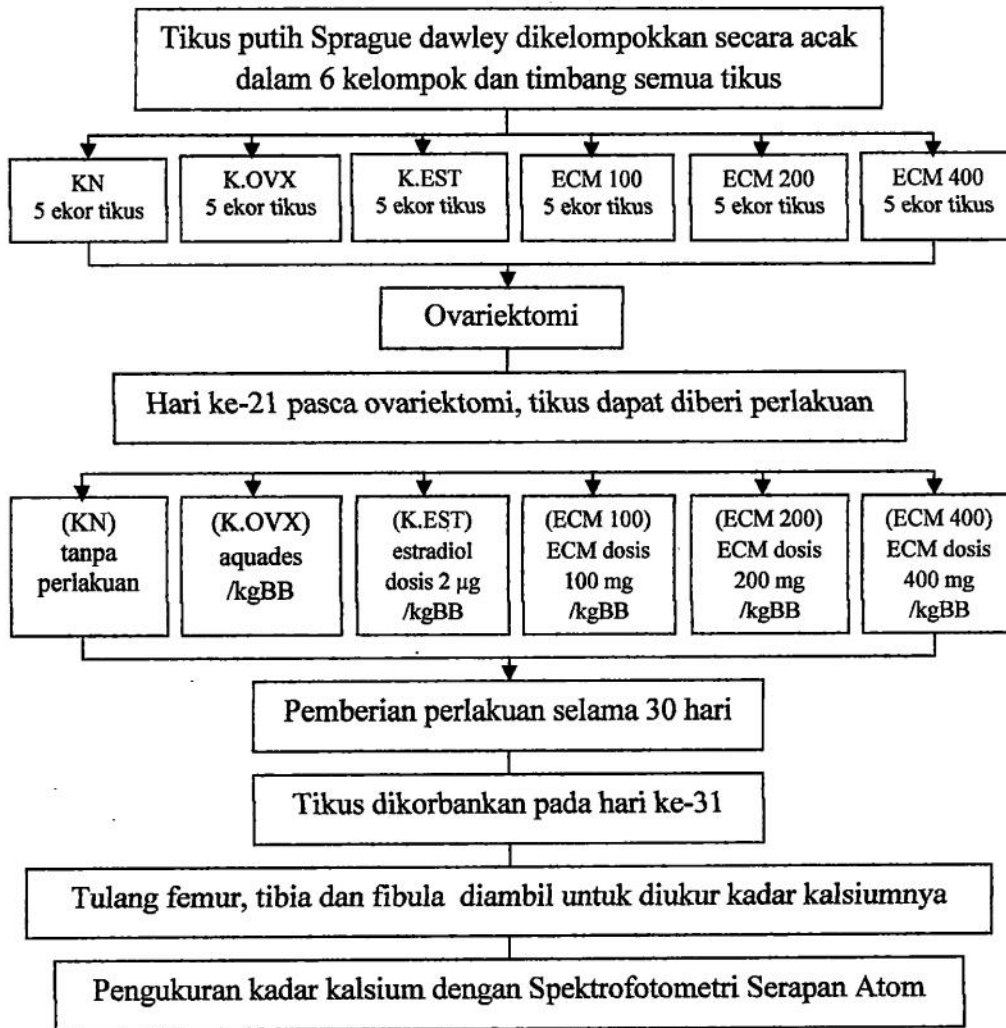
akan menghasilkan persamaan garis linier yang digunakan untuk mengetahui kadar kalsium sampel tulang tikus ovariektomi.

### G. Skema Langkah Kerja

#### 1. Pembuatan Ekstrak



## 2. Pengelompokan dan Perlakuan pada Hewan Uji



### H. Analisis Data

Data kadar kalsium tulang diuji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk*.

Data yang terdistribusi normal lalu diuji dengan *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Tukey*.