

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *true experimental in vivo* pada hewan uji dengan desain *post - test only control group design*.

B. Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah tikus betina Spraque-Dawley, umur 8 minggu, berat badan 148 - 280 gram, diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pakan tikus berupa pakan standar BR I.

Jumlah kelompok subyek pada penelitian ini disesuaikan dengan perlakuan yang akan diberikan, yaitu 6 kelompok. Jumlah hewan coba untuk masing – masing kelompok perlakuan dapat dicari dengan rumus Federer

$$(1963) : (n - 1) (t - 1) \geq 15$$

t = jumlah kelompok

n = jumlah sampel

Jumlah kelompok perlakuan = 6

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

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

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

Tempat penelitian adalah di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan UPHP Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*)
2. Variabel tergantung : Ketebalan Endometrium
3. Variabel terkontrol :
 - a. Tikus putih galur Sprague-Dawley, umur 8 minggu, berat badan 148 – 280 gram.
 - b. Cara pemeliharaan hewan uji : dilakukan aklimatisasi, dipelihara dalam kondisi kandang, pakan minum dan pencahayaan yang sama.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol biji *C. moschata* diperoleh dengan cara dikeringkan dan diekstraksi dengan teknik maserasi, penyari etanol 70% sehingga terbentuk ekstrak etanol biji *C. moschata*. Ekstrak ini diberikan pada tikus peroral dengan dosis 100 mg/kgBB, 200mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB.
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 uterus. Parameter yang akan dilihat pada penelitian ini adalah ketebalan endometrium.
3. Ketebalan endometrium adalah lapisan terdalam dari uterus setelah lapisan tengah miometrium dan lapisan paling luar perimetrium. Endometrium

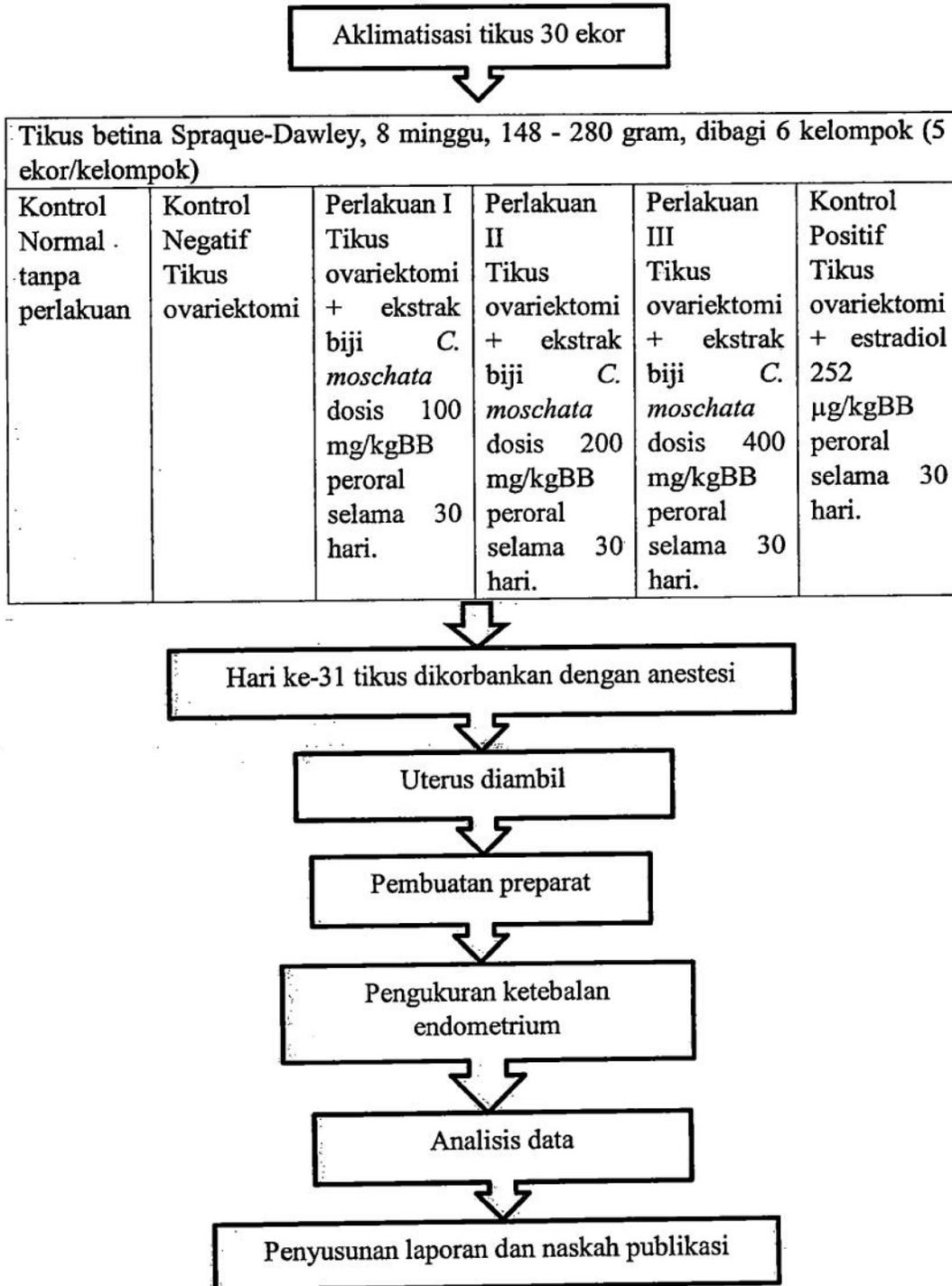
dibuat preparat dengan pengecatan HE kemudian diukur ketebalannya menggunakan mikroskop dan mikrometer dengan perbesaran 10x.

F. Alat dan Bahan 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.
3. Mikroskop dan mikrometer.
4. Alat pembuatan preparat histologi.
5. Seperangkat kit untuk pemeriksaan kadar estradiol.
6. Tikus putih galur Spraque-Dawley, umur 8 minggu, berat badan 148 - 280 gram diperoleh dari UPHP (Unit Pengelolaan Hewan Percobaan) UGM, pakan dan minum standar.
7. Biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) yang diperoleh dari produsen tepung labu kuning di Yogyakarta.
8. Ekstrak etanol biji *Cucurbita moschata* diperoleh dari biji labu kuning yang dikeringkan, dihaluskan, kemudian diekstraksi dengan cairan penyari etanol 70%. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, ekstrak dibuat di Laboratorium Biomedik FKIK UMY.

G. Alur Penelitian

Tabel 3.2 Alur Penelitian



H. Prosedur Kerja

1. Pembuatan ekstrak etanol biji labu kuning

a. Identifikasi tanaman

Identifikasi tanaman dan biji *C. moschata* yang digunakan dalam penelitian dilakukan di laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada.

b. Pembuatan ekstrak etanol biji labu kuning

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.

2. Persiapan, aklimatisasi dan ovariektomi subyek uji

Subyek uji berupa 30 ekor tikus betina Spraque-Dawley, umur 8 minggu, berat badan 148 – 280 gram diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pakan tikus berupa pakan standar BR I. Subyek penelitian diaklimatisasi selama 1 minggu kemudian ditimbang Pada hari ke-7, 25 ekor tikus kemudian diovariektomi. Selanjutnya dipelihara selama 20 hari untuk mendapatkan efek menopause.

3. Pengelompokan subjek penelitian

Setelah 20 hari, tikus dibagi menjadi 6 kelompok yaitu :

- a. Kelompok pertama tanpa diberi perlakuan apapun sebagai kontrol normal.

- b. Kelompok kedua tikus ovariektomi tanpa perlakuan sebagai kontrol negatif.
 - c. Kelompok perlakuan diberi ekstrak etanol biji *C moschata* peroral dengan dosis 100 mg/KgBB selama 30 hari berturut-turut.
 - d. Kelompok perlakuan diberi ekstrak etanol biji *C moschata* peroral dengan dosis 200 mg/KgBB selama 30 hari berturut-turut.
 - e. Kelompok perlakuan diberi ekstrak etanol biji *C moschata* peroral dengan dosis 400 mg/KgBB selama 30 hari berturut-turut.
 - f. Kelompok kontrol positif dengan pemberian estradiol peroral 252 $\mu\text{g/kgBB}$ selama 30 hari berturut-turut.
4. Pembedahan tikus dan pengukuran ketebalan endometrium

Pada hari ke-31, tikus dikorbankan kemudian diletakkan telentang, selanjutnya dinding abdomen dibuka dengan gunting dan dilakukan pengambilan endometrium. Dilakukan pembuatan preparat melintang endometrium ke bagian Patologi Anatomi UGM, kemudian dilakukan pengukuran ketebalan endometrium menggunakan mikroskop dan mikrometer perbesaran 10x.

I. Analisis Data

Data dianalisis menggunakan SPSS 15. Diuji normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui data mempunyai distribusi normal atau tidak, karena besar sampel ≤ 50 . Apabila data memiliki distribusi normal, maka diuji dengan *one way ANOVA* karena jenis hipotesis pada penelitian ini adalah komparatif tidak berpasangan dengan kelompok sampel > 2 . Apabila

terdapat perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk mengetahui letak perbedaan masing-masing kelompok. Apabila data memiliki distribusi tidak normal, maka diuji dengan *Kruskall-Wallis*.

J. Etika Penelitian

Karya Tulis Ilmiah ini telah mendapatkan persetujuan *ethical clearance* kepada Komisi Etik Penelitian FKIK UMY tentang penggunaan hewan uji sebagai subjek penelitian.