

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini menggunakan metode experimental (intervensional) *in vivo* dengan rancangan *the post test only control group design*.

##### **B. Populasi dan Sampel Penelitian**

Penelitian ini menggunakan tikus betina Sprague-Dawley berusia 8 minggu dengan berat 151-280 gram. Tikus diambil dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

Menurut WHO, besar sampel untuk penelitian jangka pendek tiap kelompok minimal 5 ekor. Pada penelitian ini jumlah sampel minimal adalah 30 ekor tikus. Dengan pertimbangan antisipasi kematian dan tikus yang sakit, maka pada penelitian ini digunakan 40 ekor tikus.

Cara pengambilan sampel diambil dari tikus yang genetik dan sifatnya sama. Untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan, pengelompokan sampel dilakukan secara acak dan dilakukan penimbangan tikus sebelum dan sesudah perlakuan. Selama dalam pemeliharaan tikus diberi pakan standar BR 1 dan diberi minum standar, setelah 40 tikus diadaptasi selama 1 minggu kemudian tikus dibagi menjadi 6 kelompok secara *simple random sampling*, dengan 5-9 ekor tikus pada tiap kelompoknya.

### C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Identifikasi Umbi *Dioscorea alata* L. dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada. Pembuatan ekstrak etanol Umbi *Dioscorea alata* L., penimbangan obat dan ekstrak etanol sesuai dosis yang ditentukan, pemberian ekstrak dan estradiol pada tikus, pembedahan setelah dilakukannya penelitian, serta pengukuran densitas tikus dilakukan di Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Sedangkan ovariectomi tikus dilakukan di Ruang Hewan Uji Laboratorium Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-September 2014.

### D. Variabel dan Definisi Operasional

#### 1. Variabel Penelitian :

- a. Variabel bebas : Ekstrak etanol Umbi *Dioscorea alata* L. dengan dosis 116; 232; dan 463 mg/kgBB/hari selama 30 hari berturut-turut.
- b. Variabel tergantung : Densitas tulang femur, tibia, dan fibula sampel.
- c. Variabel terkendali : Tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur Sprague-Dawley, umur 8 minggu, berat badan 151-280 gram yang diovariectomi, sebanyak 40 ekor. Tikus terlebih dahulu dilakukan aklimatisasi,

dipelihara dalam kondisi kandang dan pencahayaan yang sama, serta diberi pakan dan minum yang sama.

## 2. Definisi Operasional

### a. Ekstrak etanol Umbi *Dioscorea alata* L.

Ekstrak etanol Umbi *Dioscorea alata* L. diperoleh dari umbi yang diiris tipis, dikeringkan, dihaluskan, dan kemudian diekstraksi dengan cairan penyari etanol 70%. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Ekstrak dibuat di Laboratorium Biomedis FKIK UMY. Maserasi I dilakukan selama 5 hari kemudian diremaserasi selama 2 hari. Filtrat hasil maserasi dievaporasi hingga diperoleh ekstrak kental. Pemberian ekstrak dilakukan peroral dengan dosis 116; 232; dan 463 mg/kgBB/hari dengan alat bantu sonde.

### b. Densitas tulang

Densitas atau massa jenis menggambarkan suatu kerapatan benda yang memiliki rumus umum (Abdullah, 2004) :

$$\rho = \frac{m}{V}$$

$\rho$  : densitas (kg/m<sup>3</sup> atau g/cm<sup>3</sup>)

$m$  : massa (kilogram atau gram)

$V$  : volume (m<sup>3</sup> atau cm<sup>3</sup>)

Densitas sampel diukur dengan cara mendapatkan massa dan volume tulang. Tulang yang telah dikeringkan diukur massanya

dengan menggunakan timbangan analitik sedangkan volume tulangkeringdiukur dengan pletismometer. Setelah didapatkan massa dan volumenya, angka densitas didapatkan dari perhitungan rumus massa jenis umum (Nurrochmad, 2010).

c. Tikus Sprague-Dawley yang diovariectomi

Tikus *Rattus norvegicus* galur Sprague-Dawley merupakan tikus albino yang digunakan secara ekstensif dalam riset medis. Tikus Sprague-Dawley dilakukan adaptasi selama 1 minggu dan ditimbang berat badannya. Kemudian, 35 tikus dilakukan ovariectomi dan 5 sisanya tidak dilakukan ovariectomi. Tikus Sprague-Dawley ovariectomi diberi 2 perlakuan yaitu pemberian estradiol dengan dosis 252  $\mu\text{g}/\text{kgBB}/\text{hari}$  peroral dan pemberian ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. dengan dosis 116; 232; 463  $\text{mg}/\text{kgBB}/\text{hari}$  peroral. Pemberian intervensi tersebut dilakukan selama 30 hari dan kemudian dilakukan pembedahan dan diambil femur, tibia, dan fibula tikus.

## F. Instrumen Penelitian

Pada penelitian ini instrumen yang digunakan adalah :

1. Alat

Seperangkat alat gelas, timbangan analitik Mettler Toledo, pletismometer, *blender*, alat bedah tikus, sonde oral, spuit 1 cc; 2,5 cc; 5 cc, kandang tikus 40x30x10 cm, masker, dan *handscoen*.

## 2. Bahan

Ekstrak Umbi *Dioscorea alata* L. dengan dosis 116; 232; 463 mg/kgBB/hari, alkohol 70%, aqua, akuades, pakan tikus, ketamin, ampicilin, CMC Na 0,5% (*Carboxymethylcellulose natrium*), dan estradiol 252 µg/kgBB/hari.

## G. Tahap Penelitian

1. Tahap pembuatan ekstrak etanolik umbi *Dioscorea alata* L. merujuk pada penelitian Lee (2007):
  - a. Identifikasi taksonomi Umbi *Dioscorea alata* L. dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.
  - b. Umbi *Dioscorea alata* L. disiapkan sebanyak 10 kg, dipotong kecil-kecil kemudian dikeringkan dalam oven 60-70° C hingga kering.
  - c. Umbi *Dioscorea alata* L. yang sudah kering dihaluskan dengan *blender* menjadi partikel-partikel kecil atau disebut sebagai *simplisia*.
  - d. *Simplisia* ditimbang kemudian dimaserasi berulang kali dalam toples kaca dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan *simplisia* : etanol 70% = 1 : 10 pada suhu ruangan selama 5 x 24 jam sambil sesekali diaduk sampai semua komponen terekstraksi.

- e. Setelah 5x24 jam, ekstrak etanol disaring dengan kain saring dan ditampung pada toples kaca. Sisa bahan penyaringan direndam lagi dengan etanol (remaserasi) selama 2 x 24 jam, sama seperti perendaman yang dilakukan sebelumnya.
  - f. Setelah remaserasi, bahan disaring lagi dan hasilnya digabung dengan bahan yang sebelumnya sudah disaring.
  - g. Bahan yang sudah disaring kemudian diuapkan untuk menghilangkan kandungan etanol dalam bahan ekstrak pada suhu 50°C dalam water bath menggunakan *vacum pump evaporator*. Hasil penguapan berupa ekstrak kental yang ditimbang dan dicatat berapa gram hasilnya.
2. Tahap masa adaptasi tikus.
- Pada proses adaptasi, tikus dikandangkan dalam kandang plastik berukuran 40x30x10 cm yang ditutup dengan anyaman kawat selama 1 minggu. Mencit dipelihara dengan kondisi dan pakan yang sama.
3. Tahap pengelompokan tikus ke dalam 6 kelompok secara *simple random sampling*. Enam kelompok tersebut adalah :
- a. Kelompok kontrol normal (N): tikus tanpa diberi perlakuan sebanyak 5 ekor.
  - b. Kelompok kontrol negatif (OVX): tikus diovariectomi sebanyak 8ekor.

- c. Kelompok perlakuan I (OVX-DA 116) : tikus sebanyak 6 ekordiovariectomi dan diberi ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. dengan dosis 116 mg/kgBB/hari peroral selama 30 hari.
  - d. Kelompok perlakuan II (OVX-DA 232) : tikus sebanyak 6 ekor diovariectomi dan diberi ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. dengan dosis 232 mg/kgBB/hari peroral selama 30 hari.
  - e. Kelompok perlakuan III (OVX-DA 463): tikus sebanyak 6 ekor diovariectomi dan diberi ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. dengan dosis 463 mg/kgBB/hari peroral selama 30 hari.
  - f. Kelompok kontrol positif (OVX-Estradiol): tikus sebanyak 9 ekordiberi perlakuan berupa tikus diovariectomi dan diberi estradiol dengan dosis 252 µg/kgBB/hari peroral selama 30 hari.
4. Tahap ovariektomi

Dilakukan ovariektomi pada hewan uji. Setelah ovariektomi, tikus hanya diberi pakan dan minum selama 20 hari untuk proses penyembuhan luka dan menunggu munculnya efek ovariektomi.

5. Tahap pemberian intervensi ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. dan estradiol pada hewan uji coba :

Dua puluh tujuh tikus dalam kelompok OVX-DA 116, OVX-DA 232, OVX-DA 463, dan OVX-Estradiol diberi perlakuan sesuai dengan kelompok tikus yang telah ditentukan selama 30 hari. Perlakuan tersebut adalah pemberian ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. dengan dosis 116 mg/kgBB/hari pada tikus kelompok OVX-DA 116,

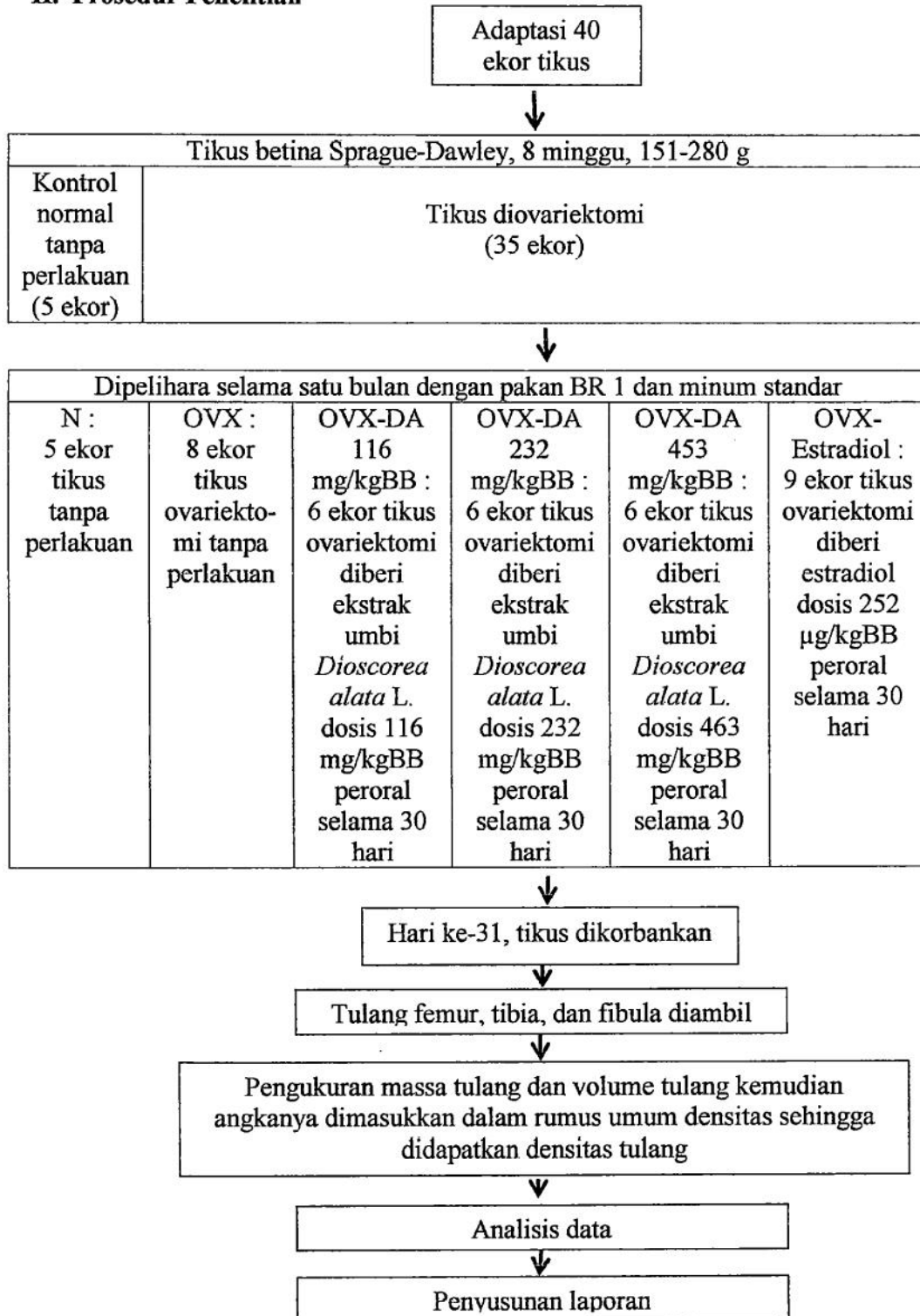
dosis 232 mg/kgBB/hari pada tikus kelompok OVX-DA 232, dan dosis 463 mg/kgBB/hari pada tikus kelompok OVX-DA 463. Ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. terlebih dahulu dilarutkan dengan aquades yang mengandung CMC Na 0,5%. Pada tikus kelompok OVX-Estradiol diberi estradiol dosis 252 µg/kgBB/hari. Ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. dan estradiol diberikan secara peroral dengan menggunakan sonde. Pada hari ke-31, semua tikus dalam percobaan dikorbankan. Organ yang diambil adalah tulang femur, tibia, serta fibulanya pada ekstremitas bawah kanan dan kiri.

6. Tahap pengukuran densitas tulang :

Tulang yang diambil melalui pembedahan terlebih dahulu dikeringkan dalam suhu kamar selama 2 minggu kemudian diukur volumenya dengan menggunakan pletismometer. Air raksa yang naik dalam tabung pada pletismometer setelah dicelupkannya tulang tersebut kemudian diukur kenaikannya. Volume air raksa yang mengalami kenaikan setara dengan volume tulang. Massa tulang ditimbang menggunakan timbangan analitik Mettler Toledo. Setelah didapatkan angka massa dan volume tulang, angka tersebut dimasukkan ke dalam rumus densitas secara umum untuk mendapatkan berapa jumlah densitas tulang tersebut. Rumus tersebut adalah  $\rho = \frac{m}{V}$  ( $\rho$  : densitas ( $\text{kg/m}^3$  atau  $\text{g/cm}^3$ ),  $m$  : massa (kilogram atau gram) dan  $V$  : volume ( $\text{m}^3$  atau  $\text{cm}^3$ )).



## H. Prosedur Penelitian



**Gambar 4. Skema Alur Penelitian**

**J. Analisis data**

Analisis data diawali dengan melakukan uji normalitas data dengan metode analitik Saphiro-Wilk (sampel  $\leq 50$ ). Data berdistribusi normal maka menggunakan uji hipotesis One Way ANOVA. Karena didapatkan perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ), analisis data dilanjutkan dengan analisis Post Hoc Test Tuckey untuk mengetahui letak perbedaan yang bermakna tersebut.

**J. Etika Penelitian**

Sebelum melakukan penelitian, terlebih dahulu meminta izin untuk melakukan penelitian kepada komite Etika Penelitian FKIK UMY.