

## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### A. Rancangan dan Variabel Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *test post test only control group*. Penelitian ini menggunakan tikus betina galur Wistar sebagai objek penelitian. Variabel penelitian dirancang menggunakan 3 variabel yaitu :

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam kelompok ini adalah Ekstrak Etanol Rimpang Kencur Dosis 500 mg/KgBB dan 1000 mg/KgBB.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu: Efek Estrogenik Kadar kolesterol Total dan trigliserida hewan uji.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu kondisi hewan uji meliputi: Umur 2-2,5 bulan, berat badan 150-200 gram, jenis kelamin tikus Betina galur *Wistar*.

#### B. Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa tikus betina galur *Wistar*. Sampel hewan uji yang digunakan memenuhi kriteria inklusi. Pengelompokan hewan uji

dilakukan secara acak lengkap dengan jumlah minimal perkelompok mengikuti rumus Federer (Federer,1991) yaitu :

$$\text{Rumus Federer : } (t-1)(r-1) \geq 15$$

Dimana :

t : banyaknya kelompok perlakuan

r : jumlah replikasi

Menurut rumus Federer banyak sampel yang diperlukan :

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

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Jumlah hewan uji yang digunakan dari perhitungan harus lebih besar atau sama dengan empat ekor tikus tiap kelompoknya. Tikus yang digunakan adalah lima ekor tiap kelompok. Tikus dipelihara dalam kandang di Laboratorium Farmakologi Universitas Wahid Hasyim Semarang. Setiap kandang berisi lima ekor tikus dan diberi pakan standar pelet BR-2 dan minuman air yang cukup untuk menghindari adanya kanibalisme karena kelaparan.

Hewan uji dalam penelitian ini di bagi menjadi enam kelompok yaitu kelompok I *baseline non ovariektomi* (K1), kelompok II *baseline ovariektomi* (K2), kelompok III perlakuan CMC-Na 0,5% (kontrol negatif) (K3), Kelompok

IV perlakuan estradiol 2 µg/hari (K4), Kelompok V perlakuan ekstrak dosis 500 mg/kg BB (P1), Kelompok VI perlakuan ekstrak dosis 1000 mg/kg BB (P2).

Berikut kriteria inklusi dan eksklusi pada penelitian :

#### 1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi penelitian ini yaitu :

- a. Tikus betina galur Wistar.
- b. Kondisi tikus sehat.
- c. Tikus aktivitas normal dan tidak cacat.
- d. Tikus berumur 2- 2,5 bulan.
- e. Berat badan 150 – 200 gram.

#### 2. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi penelitian ini yaitu :

- a. Tikus jantan.
- b. Sakit.
- c. Cacat dan tidak aktif.

### **C. Bahan dan Alat Penelitian**

#### **1. Bahan Penelitian**

##### a. Bahan utama

Rimpang kencur yang sudah diserbuk yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian Pengembangan Obat dan Tanaman Obat Tradisional

(B<sub>2</sub>P<sub>2</sub>TOOT) yang berada di Tawangmangu, Solo pada bulan Februari 2015 sebanyak 1kg.

b. Bahan ekstraksi

Etanol 70% (Merck), timbangan elektrik, kapas, kertas saring, pompa air, botol ekstrak, alat-alat gelas (Iwaki pyrex), *rotary evaporator*(Heidolp), selang, ember, toples kaca,

2. Alat Penelitian

a. Alat untuk ovariektomi

Timbangan tikus, papan operasi, alat-alat bedah, aluminium foil, spuit 1ml, spuit 2,5 ml, benang jahit, jarum jahit, kapas, perban, plester, sarung tangan, neraca elektrik (OHAUS Adventure), kamera, spuit per oral, pipet tetes, mikropipet, timbangan gram elektrik, kandang tikus ukuran 50 X 30 cm, Etanol 96% (Merck), ketamin 100 mg/ml, plain catgut suture 3/0, NaCl 0,9% (PT Otsuka), antibiotik serbuk Enbatic® (PT Erela, Semarang), Betadin® (PT. Mahakam Beta Farma, Jakarta), CMC-Na (Merck), aquadest, formalin 10% (Asia lab), estradiol 2 µg/hari (Sigma).

b. Alat dan bahan untuk uji kolesterol total dan trigliserida

Rak dan tabung reaksi, mikropipet, tabung sentrifuge (*Sentrifuge PLC Series*), *microhaematocrit*, *microtip*, *ependrof*, *vortex*(*Vortex Mixer VI* at 3000 rpm), dan spektrofotometer UV-Visibel, reagen pengendap dan reagen kit kolesterol serta standart kolesterol.

c. Alat untuk analisis data

Laptop yang dilengkapi dengan Microsoft Excel dan SPSS 16.00.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Pengumpulan Bahan Uji**

Rimpang kencur (*Kaempferia galanga*L.) diambil dari B<sub>2</sub>P<sub>2</sub>TOOT Tawangmangu.

### **2. Determinasi Tanaman**

Determinasi dilakukan untuk mengetahui identitas tanaman yang akan digunakan dalam penelitian yaitu tanaman kencur. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

### **3. Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Kencur**

Serbuk rimpang kencur sebanyak 1 kg dengan kadar air 8,41% diekstraksi dengan metode perkolasi. Proses ekstraksi disesuaikan dengan tabung perkolator yang tersedia di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang yaitu 4 tabung yang terdiri dari 2 tabung berkapasitas 250 ml dan 2 tabung berkapasitas 500 ml. Serbuk rimpang kencur ditimbang masing –masing 100 gram untuk tabung perkolator kapasitas 500 ml. Sisa serbuk kencur di simpan dalam toples tertutup dan diberi *silica* gel. serbuk yang sudah ditimbang di masukkan dalam gelas beker kemudian di basahi dengan menggunakan cairan penyari yaitu etanol 70%. Tabung perkolator ditegakkan menggunakan klem dan statif, bagian baawah tabung diberi lapisan kapas secukupnya dan selembat kertas saring dengan diameter sesuai tabung perkolator, selanjutnya rendaman serbuk dimasukkan ke dalam tabung perkolator dan diisi denga

etanol 70% sampai batas lehtabung. Tutup perkolator dipasang dan diamankan semalaman. Keesokan harinya buka kran perkolator, biarkan perkolat menetes dengan stabil dan tampung dalam erlenmeyer. Ketika cairan penyari sudah mendekati batas serbuk, cairan di isi kembali secara perlahan. Proses ekstraksi dihentikan ketika cairan perkolat sudah bening dan dilanjutkan dengan menyari serbuk yang tersisa. Ekstrak cair rimpang kencur yang diperoleh kemudian dikentalkan dengan *rotary evaporator*.

#### **4. Metode Uji *in Vivo***

##### **a. Pembuatan sediaan CMC Na 0,5 %**

Pembuatan CMC Na 0,5% dilakukan dengan menimbang 0,5 gram serbuk natrium CMC kemudian dimasukkan dalam labu takar dan dilarutkan dalam 100 ml akuades.

##### **b. Pembuatan stok ekstrak etanol rimpang kencur**

Ekstrak etanolik rimpang kencur dibuat larutan stok 8% menggunakan dosis 1000 mg/kgBB dengan cara menimbang ekstrak seberat 8 gram kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml CMC-Na 0,5%. Perhitungan larutan stok dapat dilihat paada lampiran 6. Larutan stok 8% digunakan untuk menentukan volume pemberian pada hewan uji kelompok dosis 500 mg/kgBB maupun 1000 mg/kgBB.

##### **c. Penentuan dosis 500 mg/kgBB dan 1000 mg/kgBB**

Penentuan dosis bertujuan untuk mengetahui dosis mana yang paling efektif dalam menurunkan kadar kolesterol total dan trigliserida. Penelitian efek estrogenik dari rimpang kencur belum pernah dilakukan sehingga

dalam penentuan dosis penelitian ini mengacu pada penelitian fitoestrogenik sebelumnya yang berasal dari biji labu kuning (Lestari *et al*, 2014). Kelompok kontrol negatif diberi estradiol 2 µg/hari, sedangkan kelompok perlakuan diberi ekstrak etanol rimpang kencur dosis 500 mg/kgBB dan 1000 mg/kgBB.

#### **d. Pembuatan stok estradiol**

Tablet estradiol dosis 2 mg di gerus dan di larutkan dalam 1000 ml aquadest, sehingga diperoleh hasil konsentrasi 2 µg/ml.

#### **e. Pengkondisian tikus terovariektomi**

Ovariectomi dilakukan pada 25 ekor tikus dari kelompok K2, K3, K4, P1, dan P2 dengan cara membius tikus menggunakan ketamin sebanyak 0,25 ml secara *intraperitoneal*. Bulu pada perut tikus dihilangkan dengan cara dicukur. Daerah operasi dibersihkan dengan etanol. Sebuah sayatan melintang peritoneal kecil 0,4-0,6 cm dilakukan dengan pisau bedah pada bagian tengah perut sedikit ke arah kanan. Setelah rongga peritoneal diakses, jaringan adikosal ditarik sampai tabung rahim kanan ovarium yang dikelilingi oleh sejumlah variabel lemak diidentifikasi. Ovarium dikeluarkan secara perlahan. Prosedur ini diulang untuk ovarium kiri melalui sayatan yang sama. Setelah mengidentifikasi ovarium dan uterus tanduk, pembedahan dilakukan sekitar daerah distal tanduk rahim, lalu ovarium diambil, kemudian tanduk rahim dikembalikan ke rongga peritonium. Luka ditutup dalam 2 lapisan (otot dan kulit) dengan menggunakan jahitan steril. Yodium povidon diaplikasikan untuk mensterilkan setelah penjahitan.

Prosedur aseptik tingkat tinggi di pertahankan selama operasi. Setelah operasi, tikus ditempatkan secara individual dalam kotak poliuretan selama satu minggu untuk pemulihan. Kandang dikondisikan bersih dan kering dengan menggunakan serutan kertas untuk menggantikan sekam sehingga tidak melukai bekas jahitan dan tikus tetap hangat.

#### f. Pengelompokan dan Perlakuan pada Hewan Uji

Tikus betina galur *Wistar* sebanyak 30 ekor ditempatkan dalam kandang plastik dengan alas sekam dan diberi makan berupa pellet serta diberi minum air PDAM yang masing-masing diberikan secara ad libitum. Ekstrak diberikan dalam bentuk suspensi dalam pelarut CMC-Na 0,5%. Larutan ekstrak dibuat baru sebelum diberikan kepada hewan uji.

$$\text{Volume pemberian ekstrak (ml)} = \frac{\text{beratbadantikus (g)} \times \text{Dosis} \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right)}{\text{Konsentrasiekstrak} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

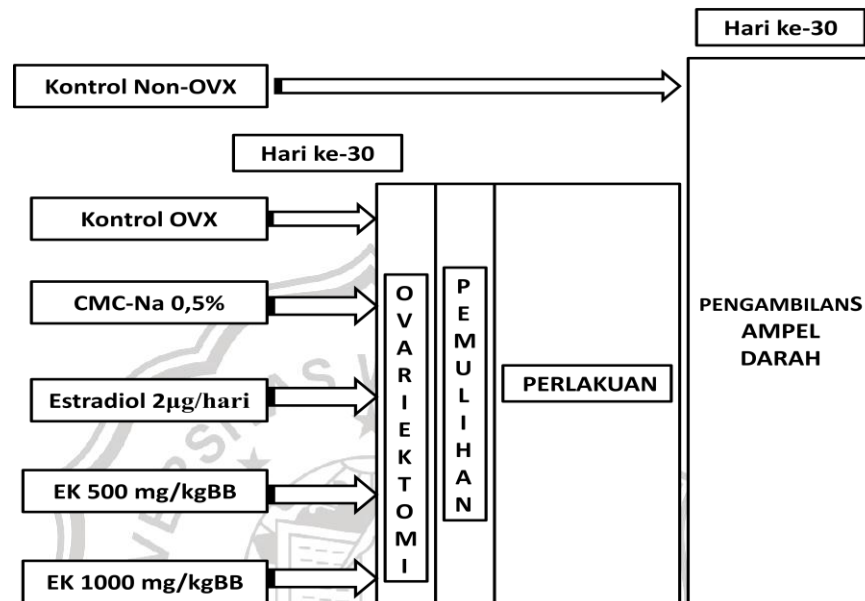
Tikus dibagi menjadi enam kelompok perlakuan dengan 5 ekor tikus tiap kelompok yaitu :

Kelompok I : *base line* non-ovariektomi, Kelompok II : *base line* ovariektomi, Kelompok III : perlakuan CMC-Na 0,5% (kontrol negatif), Kelompok IV : perlakuan estradiol 2 µg/hari, Kelompok V : perlakuan ekstrak dosis 500 mg/kg BB, Kelompok VI : perlakuan ekstrak dosis 1000 mg/kg BB.

Tikus kelompok II hingga kelompok VI diovariektomi, semua kelompok diberi perlakuan sesuai kelompok selama 30 hari. Ovariektomi merupakan proses pemotongan ovarium, sehingga pada kondisi tersebut



tikus dalam keadaan defisiensi estrogen. Selain tikus kelompok I seolah-olah terovariektomi. Percobaan dilakukan selama 1 bulan, pada akhir percobaan semua tikus diambil darahnya dari sinus orbitalis (Arjmandi, 1998). Skema penelitian seperti pada gambar 6.



**Gambar 6. Skema Pengelompokan Hewan Uji Penelitian**

#### **g. Penetapan Kadar Kolesterol Total dan Trigliserida**

##### **1) Analisis Kadar Kolesterol Total**

Analisa kadar kolesterol total dan trigliserida dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode pengukuran, baik secara kualitatif maupun kuantitatif, dari metode yang sederhana sampai metode yang kompleks. Setiap metode memiliki beberapa kelebihan dan kekurangan. Metode yang digunakan dalam penetapan kadar kolesterol total adalah dengan menggunakan metode enzimatik dengan menggunakan reagen CHOD-PAP yaitu melalui aksi esterase kolesterol, ester kolesterol yang ada dalam serum diubah menjadi kolesterol bebas dan asam lemak

(Hardjoeno, 2003). Enzim kolesterol oksidase akan mengoksidasi kolesterol bebas menjadi kolestenon dan hidrogen peroksida. Selanjutnya, hidrogen peroksida akan bereaksi dengan 4-aminoantipirin dan fenol membentuk kompleks kuinoneimin yang berwarna merah (Diasys, 2012). Cara kerja dalam penetapan ini adalah sebanyak 10 µl sampel (serum) ditambah 1000 µl reagen, campuran tersebut diinkubasi selama 10 menit dalam suhu 37<sup>0</sup> C dan dibaca absorbansinya setelah 60 menit pada panjang gelombang 500 nm (Diasys, 2012).

## 2) Analisis Kadar Triglicerida

Metode yang digunakan dalam penetapan kadar trigliserida adalah menggunakan metode enzimatik dengan menggunakan reagen GPO-PAP. Reaksi yang terjadi pada penetapan kadar trigliserida adalah dengan terbentuknya senyawa kompleks 4- (*p*-benzokinon-moimino) – fenazol yang berwarna kuning kecoklatan. Prosedur kerja dalam penelitian ini adalah sebanyak 10 µl sampel (serum) ditambah 1000 µl reagen, campuran tersebut diinkubasi selama 10 menit dalam suhu 37<sup>0</sup> C dan dibaca absorbansinya setelah 60 menit pada panjang gelombang 500 nm (Diasys, 2012).

## E. Analisis Data

Data nilai kolesterol total dan trigliserida yang sudah diperoleh dianalisis secara statistik, dilakukan uji pendahuluan dengan menggunakan uji normalitas dan homogenitas menggunakan *Shapiro Wilk* Test. Indikator yang menyatakan

bahwa data kadar kolesterol total dan trigliserida memiliki pola distribusi normal dan varian yang homogen adalah nilai signifikansi yang lebih besar dari 0,05 ( $p > 0,05$ ). Hasil analisis tersebut didapatkan sebaran data normal dan homogen, sehingga data nilai kolesterol total dan trigliserida dianalisis dengan uji parametrik *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan, oleh karena itu dilanjutkan dengan uji *Tukey* menggunakan *Software Statistical and Service Solution (SPSS) 16.0 for Windows*. Percobaan pemberian ekstrak etanol rimpang kencur pada tikus betina galur Wistar terovariotomi dikatakan mempunyai efek menurunkan kolesterol total dan trigliserida apabila hasil uji *Tukey* menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok perbedaan ekstrak etanol rimpang kencur dosis 500 mg/kgBB dan dosis 1000mg/kgBB dengan kelompok kontrol ovariektomi.

