

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimental murni dimana kelompok perlakuan diberi ekstrak belimbing wuluh (*Averrhoa Bilimbi L.*) Rancangan penelitian menggunakan rancangan eksperimental *Randomized Post Test Only Control Group Design*⁴¹.

4.2. POPULASI, SAMPEL DAN BESAR SAMPEL

Dalam penelitian ini menggunakan populasi **tikus jantan galur wistar** usia 5 bulan, dengan berat badan 250-350 gram dan sehat. Sampel dipilih dari populasi dengan menggunakan teknik *simple random sampling* (acak sederhana) dengan cara pengundian⁴². Tikus diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM. Besar sampel ditetapkan dengan menggunakan rumus⁴³ :

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

Dimana t = jumlah perlakuan

n = besar ulangan

Dari rumus di atas didapatkan sampel sebanyak : $(3-1)(n-1) \geq 15$, $n \geq 8,5$

Jadi jumlah sampel minimal sesuai rumus tersebut diatas adalah 8,5, dan untuk menjaga agar tingkat representatifnya tinggi apabila terjadi *drop out*, maka sampel diperlebar menjadi 10 ekor tiap kelompok. Jadi jumlah keseluruhan sampel adalah :

10 x 3 = 30 ekor tikus. Jumlah tikus betina sebagai obyek yang dibutuhkan adalah sama dengan tikus jantan yaitu 30 ekor tikus betina yang sedang dalam periode estrus.

4.3. VARIABEL PENELITIAN

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak belimbing wuluh (*Averrhoa Bilimbi L.*)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar testosteron bebas dan libido tikus jantan galur wistar.

Variabel pengendalinya adalah :

1. Jenis tikus
2. Umur tikus
3. Berat tikus
4. Makanan tikus
5. Perawatan tikus
6. Lingkungan dan sanitasi kandang tikus

4.4. DEFINISI OPERASIONAL

1. Variabel bebas

Ekstrak belimbing wuluh adalah buah belimbing wuluh yang yang dibuat ekstrak dengan metode maserasi. Ekstrak belimbing wuluh diberikan pada tikus jantan galur wistar dengan dosis 20 gram dan 40 gram buah segar/kg BB, yang dilarutkan dalam air menjadi sebanyak 1,5 ml. Ekstrak diberikan per oral dengan menggunakan spuit yang telah dimodifikasi ujungnya.

2. Variabel tergantung

Kadar hormon testosteron bebas adalah kadar hormon testosteron bebas yang diukur dari serum darah tikus yang diambil pada pagi hari. Serum diperiksa dengan menggunakan teknik *Enzyme Linked Fluorescent Immuno-Assay* (ELFA), dan hasilnya dinyatakan dalam ng/ml. Kadar hormon testosteron bebas kurang dari normal jika kurang dari 3 ng/ml.

Libido tikus adalah nafsu kelamin tikus jantan galur wistar yang diukur dengan melakukan pengamatan terhadap perilaku tikus jantan dalam mendekati (*introduksi*) dan penunggang (*climbing*) tikus betina selama 1 jam. Libido dicatat dengan banyaknya jumlah pendekatan (*introduksi*) ditambah banyaknya jumlah penunggang (*climbing*). Kadar normal penghitungan libido tikus adalah 15-20 x / 1 jam pengamatan.

3. Variabel Pengendali

- Jenis tikus : tikus jantan galur wistar
- Umur tikus : 5 bulan
- Berat tikus : 250-350 gram
- Makanan tikus : tikus diberi makan dengan ransum biasa, diberikan sebanyak 5 gram perhari per 100 gram BB dan diberi minum dengan aquades sebanyak 8 ml perhari per 100 gram BB.

- Perawatan, lingkungan dan sanitasi kandang tikus : tikus ditempatkan dalam kandang secara sendiri-sendiri dengan suhu lingkungan antara 21-24 derajat Celcius. Kandang dibersihkan dari kotoran tikus sekali sehari.

4.5. BAHAN DAN ALAT PENELITIAN

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak belimbing wuluh yang diberikan dalam dosis 20 gram dan 40 gram buah segar/kg BB. Dosis ini mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Panghiyangani.

Alat penelitian yang dipergunakan :

- a. Timbangan untuk menimbang tikus
- b. Timbangan untuk menimbang belimbing wuluh
- c. Instrumen pembuatan ekstrak belimbing wuluh dengan metode maserasi, antara lain *blender*, *rotary evaporator*, dan pemanas *water bath*
- d. Lemari pendingin untuk menyimpan ekstrak belimbing wuluh
- e. Spuit yang sudah dimodifikasi untuk memasukkan ekstrak ke mulut tikus
- f. Mikroskop dan instrument untuk pemeriksaan periode *oestrus* tikus betina
- g. Instrumen untuk pengambilan darah tikus melalui sinus orbital dan alat sentrifugasi untuk mendapatkan serum darah tikus
- h. Instrumen untuk pemeriksaan testosteron bebas dengan metode ELFA yaitu alat mini-Vidas dan reagen pemeriksaan testosteron
- i. Pena dan buku catatan untuk menghitung jumlah pendekatan dan penunggang tikus.

4.6. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di LPPT UGM Yogyakarta. Pemeriksaan ELFA dilakukan di Laboratorium RS.Sardjito Yogyakarta. Pelaksanaan penelitian direncanakan selama 15 hari dengan pemberian perlakuan 1x sehari setiap pagi selama 10 hari⁴⁴.

Jadwal Penelitian :

- a. 1 Desember 2005 – 20 Februari 2006 : Penyusunan Proposal Penelitian
- b. 1 April 2006 – 21 April 2006 : Pengumpulan Data
- c. 22 April 2006 – 30 April 2006 : Analisa Data
- d. 1 Mei 2006 – 30 Juni 2006 : Penyusunan Laporan Penelitian

4.7. CARA PENELITIAN

Sampel penelitian sebanyak 30 ekor tikus jantan galur wistar ditempatkan dalam kandang masing-masing, 1 kandang 1 ekor tikus. Perlakuan diberikan pada masing-masing kelompok sebagai berikut :

- Kelompok I : 10 ekor tikus diberikan aquadest sebanyak 1,5 ml sebagai kelompok kontrol ditambah pakan standar
- Kelompok II : 10 ekor tikus diberikan ekstrak belimbing wuluh dengan dosis 20 gr/kgBB yang dilarutkan dalam air menjadi sebanyak 1,5 ml ditambah pakan standar
- Kelompok III : 10 ekor tikus diberikan ekstrak belimbing wuluh dengan dosis 40 gr/kgBB yang dilarutkan dalam air menjadi sebanyak 1,5 ml ditambah pakan standar.

Pembuatan ekstrak belimbing wuluh dengan metode maserasi. Pembuatan ekstrak belimbing wuluh ini dimaksudkan agar bahan aktif yang terkandung didalamnya sedapat mungkin tidak berubah dari material awal dan menjamin pemeliharaan jangka panjang dari kandungan bahan selama proses penyimpanan⁴⁵. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Belimbing wuluh diblender bersama dengan ethanol 96% kemudian didiamkan selama 24 jam ditempat yang terlindung dari cahaya langsung (untuk mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna), selanjutnya disaring. Filtrat yang didapat selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan pengurangan tekanan pada pemanas *water bath* suhu 70°C. Ekstrak kental yang diperoleh dari langkah tersebut kemudian diuapkan lagi dengan pemanas *water bath* dan akhirnya didapatkan ekstrak belimbing wuluh.

Setiap 1 ekor tikus ditempatkan dalam 1 kandang. Tikus diadaptasikan dengan lingkungan selama 5 hari terlebih dahulu sebelum diberi perlakuan dengan memperhatikan standar perawatan tikus sebagai hewan percobaan. Bahan diberikan peroral dengan menggunakan spuit yang telah dimodifikasi ujungnya. Bahan diberikan 1 kali sehari, setiap sore hari 1 jam sebelum pengumpulan data aktivitas libido selama 10 hari. Pada malam hari setelah pemberian ekstrak belimbing wuluh pada tikus jantan, tikus betina yang sedang dalam periode *oestrus* dimasukkan ke dalam kandang tikus jantan. Periode *oestrus* tikus betina diketahui dengan mengamati tingkah laku tikus betina, yaitu adanya peningkatan aktifitas dan pemeriksaan mikroskopik usap vagina yang menunjukkan gambaran 100% sel epitel

tanduk. Pengukuran libido dilakukan setiap hari selama 10 hari dan dilakukan pada malam hari. Data libido tikus dilihat dari jumlah pendekatan dan penunggang tikus jantan pada tikus betina galur wistar selama 1 jam.

Data tentang kadar testosteron bebas diambil dari serum darah tikus yang dikumpulkan dari sinus orbital tikus yang diambil pada pagi hari setelah dilakukan perlakuan selama 10 hari dengan menggunakan kapiler mikrohematokrit. Darah yang keluar ditampung dalam tabung melalui dinding sampai volume ± 2 ml, kemudian didiamkan selama 30 menit, setelah itu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Serum yang terpisah kemudian diambil untuk pemeriksaan kadar hormon testosteron bebas dengan metode ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Immuno-Assay*). Prinsip pemeriksaan testosteron bebas dengan metode ELFA merupakan kombinasi metode kompetisi *immunoassay enzyme* dengan deteksi fluorescent. SPR (*Solid Phase Receptacle*) bertindak sebagai fasa padat dalam pengujian. Sampel yang akan diperiksa dimasukkan kedalam *well* yang berisi *conjugate* berupa *alkaline phosphatase* yang dilabel dengan derivat testosteron. Testosteron serum dan derivat testosteron pada *conjugate* akan bersaing pada tempat antibody spesifik anti-testosteron yang melapisi pada permukaan SPR. Komponen yang tidak terikat akan dibuang melalui proses pencucian. Konjugat enzim mengkatalisis hidrolisis substrat dan dianalisis dengan fluoresensi pada panjang gelombang 450nm. Intensitas fluoresensi menunjukkan proporsi konsentrasi sampel. Pada akhir pemeriksaan, nilai sampel otomatis akan dihitung dengan instrumen yang dihubungkan dengan kurva kalibrasi yang tersimpan pada memori ⁴⁶.

4.8. PROSEDUR PENGUMPULAN DATA

Data kadar testosteron bebas didapatkan dengan cara :

1. Mengambil darah tikus sebanyak 2 ml dengan kapiler mikrohematokrit dari sinus orbitalis, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi
2. Tabung reaksi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit untuk memisahkan serum dan sel-sel darah
3. Dengan menggunakan alat mini-Vidas, serum dan reagen ditempatkan dalam Reagent Strip siap pakai dan solid phase berupa *Solid Phase Receptacle* (SPR). Mini-Vidas adalah *immunology analyzer* yang bekerja secara otomatis dengan menggunakan teknologi pembacaan *Enzyme-Linked Fluorescence Immuno-Assay* (ELFA). Proses pengetesan dilakukan secara otomatis dan hasil pembacaan Fluorescent yaitu *Relative Fluorescent Value* (RFV) akan dikonversikan menjadi hasil akhir tes kualitatif dan kuantitatif.

Data jumlah libido tikus didapatkan dengan cara :

1. Tikus wistar jantan kelompok perlakuan ditempatkan pada kandangnya
2. Tikus betina galur wistar usia 3-4 bulan yang sedang dalam periode *oestrus* dimasukkan dalam kandang tikus jantan.
3. Diamati dan dihitung jumlah pendekatan (*introduksi*) dan penunggang (*climbing*)
4. Jumlah libido tikus didapat dengan menambah banyaknya jumlah pendekatan (*introduksi*) dan jumlah penunggang (*climbing*) masing-masing tikus.

4.9. ANALISIS DATA

1. Manajemen data

Setelah data tentang pengukuran kadar testosteron bebas dan libido tikus terkumpul, maka akan dilakukan editing, kemudian di-*coding* dan setelah itu data di-*entry* dalam file komputer. Data yang sudah di-*cleaning* kemudian dilakukan analisis statistik dengan menggunakan SPSS 10,12 *for windows* dan NCSS⁴⁷.

2. Analisis statistik deskriptif

Analisis statistik deskriptif dilakukan untuk melihat distribusi kadar hormon testosteron bebas tikus jantan galur wistar secara deskriptif dengan membandingkan gambaran histogramnya dengan kurva normal. Setelah itu dilanjutkan dengan uji Shapiro-Wilk untuk menyimpulkan apakah distribusinya normal atau tidak. Kemudian dilakukan perhitungan *mean*, *Standar Deviasi* (SD) dan *median* kadar hormon testosteron bebas menurut kelompok perlakuan, kemudian disajikan dalam bentuk tabel silang. Dibuat grafik *box-plot* kadar hormon testosteron bebas menurut kelompok perlakuan untuk melihat secara deskriptif perbedaan diantara kelompok⁴⁷.

Data libido yang telah terkumpul dari banyaknya jumlah pendekatan (*introduksi*) dan penunggang (*climbing*) dilakukan penghitungan *The Area Under The Curve* (AUC) yang lebih sesuai untuk pengukuran data yang berulang dan selanjutnya dilakukan uji Shapiro-Wilk untuk menyimpulkan apakah distribusinya normal atau tidak. Kemudian dilakukan perhitungan *mean*, *Standar Deviasi* (SD) dan *median* jumlah pendekatan (*introduksi*) dan penunggang

(*climbing*) menurut kelompok perlakuan, kemudian disajikan dalam bentuk tabel silang, selanjutnya dibuat grafik menurut kelompok perlakuan untuk melihat secara deskriptif perbedaan diantara kelompok ^{48,49}.

3. Analisis statistik analitik

Analisis statistik analitik dilakukan sebagai uji beda antara kelompok perlakuan terhadap kadar hormon testosteron bebas dan libido. Analisis statistik analitik untuk kadar testosteron bebas, apabila distribusinya normal, maka akan dilakukan uji *Oneway Anova*, dilanjutkan dengan *Post-Hoc Test*. Apabila distribusi tidak normal, akan dipakai uji Kruskal-Wallis, dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney dengan program SPSS. Analisis statistik analitik untuk libido, apabila distribusinya normal, maka akan dilakukan uji *Oneway Anova*, apabila distribusi tidak normal, akan dipakai uji Kruskal-Wallis dengan program NCSS dengan menggunakan *z-value*. Hasil uji statistik akan ditampilkan dalam bentuk tabel dan diberi narasi ⁴⁷.

4.10. ALUR PENELITIAN

