

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental* (eksperimental sesungguhnya) dengan dipilih pendekatan *post test only control group design* yang dikerjakan di laboratorium dengan *invitro*. Menurut Zainuddin (2011), eksperimental adalah suatu penelitian hubungan sebab akibat yang dilakukan terhadap kejadian/fenomena yang terjadi akibat adanya intervensi dari peneliti. Pada penelitian eksperimental persoalan pokok penelitian adalah kejadian yang akan terjadi akibat adanya intervensi (perlakuan/*treatment*) oleh peneliti. Salah satu jenis eksperimental adalah *true experimental* (eksperimental sesungguhnya), yaitu rancangan eksperimental yang memenuhi tiga syarat, antara lain ada kelompok kontrol, ada random, dan ada replikasi. Sedangkan pendekatan *post test only control group design* adalah salah satu jenis *true experimental*, dimana fenomena yang terjadi akibat adanya intervensi dari peneliti (respon) hanya diamati setelah perlakuan/intervensi tersebut diberikan.

Jadi dalam penelitian ini perlakuan atau intervensi peneliti yaitu cypermethrin berbagai dosis terhadap tikus (*Rattus norvegicus*) betina galur wistar. Sedangkan fenomena yang terjadi akibat adanya perlakuan/intervensi dari peneliti hanya diamati setelah perlakuan/intervensi tersebut diberikan dalam penelitian ini adalah ekspresi BCL-2 pada sel granulosa dan jumlah folikel antral pada ovarium tikus.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Tempat Penelitian

1. Laboratorium Fisiologi / Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat pemeliharaan *Rattus norvegicus*
2. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat pemeriksaan ekspresi Bcl 2 sel granulosa (Imunohistokimia)
3. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat pemeriksaan jumlah folikel antral ovarium *Rattus norvegicus*

4.2.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan mulai bulan Juni – Juli 2017

4.3 Sampel Penelitian

Sampel diambil secara acak dari populasi terjangkau yaitu *Rattus norvegicus* galur wistar dari Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang kemudian dipindahkan ke Laboratorium Fisiologi Universitas Brawijaya Malang.

4.3.1 Kriteria Sampel

Kriteria sampel terdiri dari kriteria inklusi dan kriteria eksklusi. Kriteria inklusi tikus betina dan sehat, umur 10 – 12 minggu, berat badan 100 – 150 gram, tidak bunting dan tidak ada kelainan anatomi. Kriteria eksklusi : tikus dalam keadaan sakit atau mati selama perlakuan.

4.3.2 Besar Sampel

Menurut Supranto (2000) untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial, secara sederhana dapat dirumuskan sebagai berikut :

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

t = banyaknya kelompok perlakuan

r = banyaknya replikasi

$$\{(4-1) (r - 1)\} \geq 15$$

$$3 (r - 1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Besar sampel diperoleh dari mengalikan jumlah replikasi dengan jumlah kelompok. Di temukan replikasi ada 6 dan jumlah kelompok perlakuan ada 3 dan 1 kelompok kontrol sehingga besar sampel didapatkan 24 ekor tikus. Untuk menghindari adanya sampel yang sakit atau mati karena perlakuan maka sampel dilebihkan masing – masing kelompok 2 ekor Sehingga didapatkan jumlah keseluruhan sampel adalah 32 ekor tikus dengan masing – masing kelompok sejumlah 8 ekor tikus.

4.3.3 Pembagian Kelompok

Besar sampel sejumlah 32 ekor tikus betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar dibagi menjadi 4 kelompok yaitu

K1 : Kelompok kontrol adalah kelompok tanpa perlakuan terdiri dari 8 ekor tikus betina, pada kelompok ini diberikan *aquadest* saja.

P1 : Kelompok perlakuan 1 terdiri dari 8 ekor tikus betina, diberikan larutan cypermethrin dalam *aquadest* dengan dosis 10 mg/kg BB

P2 : Kelompok perlakuan 2 terdiri dari 8 ekor tikus betina, diberikan larutan cypermethrin dalam *aquadest* dengan dosis 15 mg/kg BB

P3: Kelompok perlakuan 3 terdiri dari 8 ekor tikus betina, diberikan larutan cypermethrin dalam *aquadest* dengan dosis 20 mg/kg BB

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Independen (Bebas)

Variabel independen pada penelitian ini adalah pemberian cypermethrin per oral

4.4.2 Variabel Dependen (Terikat)

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah ekspresi Bcl-2 pada sel granulosa dan jumlah folikel antral pada ovarium.

4.5 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur/ Cara ukur	Hasil Ukur	Skala data
Cypermethrin per oral	Insektisida jenis piretroid yang bermerk dagang Rizotin 100 EC dengan kandungan aktif cypermethrin 100 gr/L diberikan dengan 3 dosis yang berbeda yaitu 10, 15 dan 20 mg/kg BB diberikan selama 28 hari	Mengukur dengan spuit	Mendapatkan dosis cypermethrin yang sesuai yaitu 10, 15 dan 20 mg/kg BB	Ratio
Ekspresi Bcl-2 pada sel granulosa	Menghitung rata-rata sel granulosa yang coklat pada inti yang mengekspresikan Bcl-2 dengan menggunakan High Power Field (HPF) pembesaran 1000x diamati dengan mikroskop pada 20 lapang pandang.	Imunohistokimia	Jumlah sel granulosa yang berwarna coklat pada inti dengan pembesaran 1000x pada 20 lapang pandang	Ratio
Jumlah Folikel Antral	Hasil menghitung folikel antral pada ovarium <i>Rattus norvegicus</i> yang dibedah saat fase proestrus dan telah dipapar dengan cypermethrin selama 28 hari yang diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x dengan ciri – ciri a. Memiliki lebih dari satu lapis sel folikel, b. Terbentuknya antrum follikuli yang berisi cairan follikuli	Histologi dan pewarnaan menggunakan HE diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x kemudian dijumlah pada seluruh lapang pandang ovarium	Jumlah folikel antral yang sehat	Ratio

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan bahan- bahan antara lain

a. Bahan uji

Cypermethrin dengan merk dagang Rizotin 100 EC yang diproduksi oleh CV. Uni Agro berupa cairan berbentuk emulsi

b. Bahan untuk pemeliharaan hewan coba

Terdiri dari sekam untuk alas kandang, pakan dari produk PT Comfeed Indonesia dan minum air matang *ad libitum* yang diberikan setiap hari

c. Bahan untuk pengambilan organ ovarium

Yaitu ketamine 1% sebagai bius dan *Neutral Buffer* untuk mengawetkan organ sebanyak 1 liter

d. Bahan pemeriksaan dan pembuatan sediaan PA serta imunohistokimia

1) Pembuatan prepaarat histologis dan *hematoksillin eosin*

- a) Natrium khlorida
- b) Cat utama Harris Hematoksillin
- c) Cat eosin 1%
- d) Xylol 2 liter
- e) Alkohol (70%, 80%, 90%, 96%, 100%)
- f) Parafin 500 mg
- g) Entelan

2) Pewarnaan Ekspresi Bcl-2

- a) H₂O₂ 3%
- b) Larutan PBS

3) Pemeriksaan ekspresi Bcl-2 dengan imunohistokimia

- a) Slide jaringan melalui preparat histopatologi ovarium *Rattus norvegicus*
- b) Etanol 90%, 80%, 70%
- c) Deparafinisasi
- d) Antibodi primer Bcl-2 Merk R&D *monoclonal Catalog #MAB8272*
- e) *Immunostaining kit*
- f) Larutan PBS (Phospat Buffer Saline)
- g) *Buffer sitrat* dengan pH 6.0
- h) Tissue
- i) SA-HRP (*Streptavidin Horseradish Peroxidase*)
- j) Ependof

4.6.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan :

- a. Alat untuk pemeliharaan hewan coba :
 - 1) Kandang tikus berupa box plastik berukuran 45 cm x 35.5 cm x 14,5 cm sebanyak 8 buah, penutup kandang dari kawat berbentuk jaring,
 - 2) Tempat makanan dan minuman
- b. Alat untuk pemberian cypermethrin : timbangan dengan ketelitian 0,01 gram, spuit 3 cc dan ujungnya dipasang sonde
- c. Alat untuk menimbang berat badan tikus menggunakan timbangan elektrik
- d. Alat untuk pengambilan organ ovarium tikus : toples kaca tertutup, alat bedah minor (scalpel, pinset, gunting, klem), papan untuk pembedahan, wadah untuk menaruh sementara organ ovarium
- e. Alat untuk pemeriksaan jumlah folikel antral : mikroskop cahaya dan dilengkapi dengan digital camera yang telah dikalibrasi serta dilengkapi dengan software pengolah gambar *Image Reaster*

- f. Pemeriksaan imunohistokomia Bcl-2 : slide, mikropipet, chamber
- g. Pemeriksaan ekspresi Bcl-2 : mikroskop

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Aklimisasi Hewan Coba

Rattus norvegicus betina galur Wistar dibiarkan 1 minggu di dalam kandang untuk beradaptasi dengan suasana laboratorium dan untuk menghilangkan stres. Selama aklimatisasi tikus diberikan pakan standar dan minum air matang. Setelah diaklimatisasi tikus dikelompokkan menjadi 4 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan.

4.7.2 Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus dimasukkan ke dalam kandang yang terbuat dari baskom plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan diberi tutup kawat yang kuat. Dasar kandang diberi sekam setebal 0,5-1 cm dan diganti setiap 3 hari sekali. Setiap kandang berisi 4 ekor tikus. Cahaya ruangan dibuat 12 jam terang dan 12 jam gelap, temperatur ruangan pada kisaran 27-28 °C Tikus diberikan pakan standar yang berbentuk pallet (bulat) merek Comfeed, dan minumannya diberikan air matang *ad libitum*. Pemberian makan diberikan 1x sehari pada siang hari sekitar jam 12.00 sebanyak 40 gr/hari/ekor.

4.7.3 Penimbangan Berat Badan Tikus

Penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap minggu dengan menggunakan timbangan elektrik dan wadah plastik. Cara penimbangan dilakukan dengan meletakkan timbangan ditempat yang datar, kemudian timbangan dikalibrasi dengan cara meletakkan wadah plastik diatas timbangan. Setelah itu tikus dimasukkan kedalam wadah plastik lalu timbang dan lakukan pencatatan. Tujuan penimbangan ini

adalah untuk mengetahui peningkatan atau penurunan berat badan tikus saat dilakukan penelitian.

4.7.4 Pemberian Cypermethrin

Dalam penelitian ini menggunakan pestisida jenis pyrethroid tipe II golongan cypermethrin, dengan merk dagang Rizotin 100 EC yang diproduksi CV Uni Agro dalam bentuk emulsi. Cypermethrin diberikan peroral dengan sonde, sampel yang digunakan sebanyak 32 ekor tikus yang masing-masing diberikan 1 kali sehari pada siang hari. Dosis yang diberikan yaitu 10, 15 dan 20 mg/kg BB. Lama pemberian 28 hari.

4.7.5 Pembuatan Larutan Cypermethrin dan Penentuan Dosis

Pembuatan larutan cypermethrin sesuai dosis yang ditentukan yaitu 10, 15 dan 20 mg/kg BB, terlebih dahulu disiapkan stok larutan yang sudah tersedia dari pabrik yaitu 100mg/L. Kemudian larutan uji dibuat dengan mengencerkan larutan stok, dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Keterangan :

C1 : Konsentrasi larutan stok

C2 : Konsentrasi larutan uji yang digunakan

V1 : Volume larutan stok

V2 : Volume larutan uji yang ingin dibuat

Larutan uji yang dibuat untuk setiap hari. Pemberian cypermethrin per tikus tiap hari adalah 1 ml yang terdiri dari cypermethrin dan *aquadest*. Pembuatan dosis cypermethrin 10, 15 dan 20 mg/kg BB sebagai berikut :

1) Cypermethrin dosis I (10 mg/kg BB)

$$\begin{aligned}C1 \cdot V1 &= C2 \cdot V2 \\100 \text{ mg} \cdot V1 &= 10 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml} \\V1 &= \frac{10 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml}}{100 \text{ mg}} \\V1 &= 0,1 \cdot 1 \text{ ml} \\V1 &= 0,1 \text{ ml/kg BB}\end{aligned}$$

Jika berat tikus hanya 100 gram maka dibutuhkan 0,01 ml larutan stok cypermethrin untuk membuat dosis 10 mg/kg BB kemudian ditambahkan dengan 0,99 ml *aquadest*

2) Cypermethrin dosis II (15 mg/kg BB)

$$\begin{aligned}C1 \cdot V1 &= C2 \cdot V2 \\100 \text{ mg} \cdot V1 &= 15 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml} \\V1 &= \frac{15 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml}}{100 \text{ mg}} \\V1 &= 0,15 \cdot 1 \text{ ml} \\V1 &= 0,15 \text{ ml/kg BB}\end{aligned}$$

Jika berat tikus hanya 100 gram maka dibutuhkan 0,015 ml larutan stok cypermethrin untuk membuat dosis 15 mg/kg BB kemudian ditambahkan dengan 0,85 ml *aquadest*.

3) Cypermethrin dosis III (20 mg/kg BB)

$$\begin{aligned}C1 \cdot V1 &= C2 \cdot V2 \\100 \text{ mg} \cdot V1 &= 20 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml} \\V1 &= \frac{20 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml}}{100 \text{ mg}} \\V1 &= 0,2 \cdot 1 \text{ ml} \\V1 &= 0,2 \text{ ml/kg BB}\end{aligned}$$

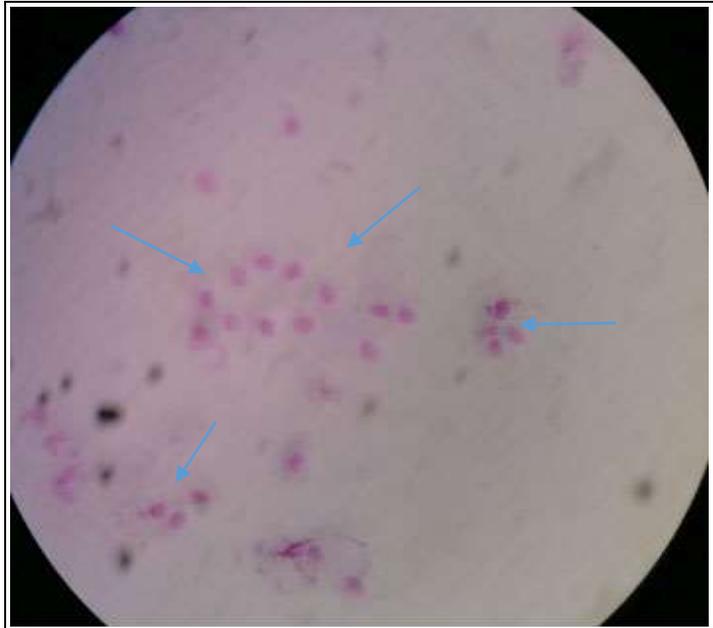
Jika berat tikus hanya 100 gram maka dibutuhkan 0,02 ml larutan stok cypermethrin untuk membuat dosis 20 mg/kg BB kemudian ditambahkan dengan 0,98 ml *aquadest*.

4.7.6 Penentuan Siklus Estrus dengan Prosedur Swab Vagina

Swab vagina dilakukan pada hewan coba untuk memastikan hewan coba pada masa proestrus. Dilakukan pada hari ke 29 atau setelah dilakukan perlakuan. Jika pada hari ke 29 tidak dalam masa proestrus maka yang dilakukan adalah menunggu sampai masa proestrus. Adapun langkah – langkah swab vagina adalah sebagai berikut :

- a. Menyiapkan alat dan bahan
- b. Memakai sarung tangan
- c. Mencilupkan *cotton bud* dalam NaCl 0,9%
- d. Memosisikan tikus terlentang dan memasukkan *cotton bud* ke dalam vagina dan diputar 360⁰ dengan sudut 45⁰ sebanyak 1-2 kali
- e. Hasil usapan pada *cotton bud* dioleskan pada kaca obyektif dan dikeringkan
- f. Preparat yang sudah dikeringkan kemudian dimasukkan ke dalam alkohol absolut lalu difiksasi selama 3 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan.
- g. Selanjutnya preparat direndam dalam larutan giemsa selama 15 menit, diangkat kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan dengan cara diangin – anginkan.
- h. Mengamati morfologi sel di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Hasilnya disebut fase proestrus jika pada pemeriksaan apusan vagina ditemukan lebih banyak epitel berinti. Terjadi pertumbuhan endometrium, uterus

dan serviks. Pada penelitian ini pembedahan dilakukan pada fase proestrus karena fase ini merupakan fase folikuler pada *Rattus norvegicus*, pada fase ini terjadi peningkatan FSH yang dapat mempengaruhi perkembangan folikel di ovarium. Dibawah ini adalah hasil pemeriksaan swab vagina dengan fase proestrus tampak epitel berinti lebih banyak daripada epitel bertanduk.



Gambar 4.1 Fase proestrus pada *Rattus norvegicus*

4.7.7 Pelaksanaan Penelitian

Hewan coba terdiri atas 4 kelompok : 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok terdiri atas 8 ekor tikus. Kelompok perlakuan diberi paparan cypermetrin peroral dengan sonde dengan dosis 10, 15, 20 mg/kg BB. Pemberian cypermethrin dilakukan 1 kali sehari pada siang hari setelah masa adaptasi / aklimatisasi. Lama paparan adalah 28 hari.

4.7.8 Pembedahan Hewan Coba

Tindakan pembedahan dilakukan setelah 28 hari pemberian paparan, dan pada fase proestrus. Penatalaksanaan pembedahan adalah sebagai berikut :

- a. Menyiapkan peralatan pembedahan minor : ketamine injeksi, etanol 70%, gunting, pinset dan botol tertutup berisi formalin 10% untuk tempat organ serta blanko untuk pencatatan.
- b. Menganastesi tikus dengan cara menginjeksi ketamine 1 % pada paha tikus dengan dosis 20 mg. .
- c. Memastikan tikus tidak merasakan nyeri dengan menggunakan pinset cirurgis.
- d. Tikus yang sudah tidak bergerak diletakkan diatas alas papan dengan posisi perut menghadap ke atas lalu difiksasi menggunakan jarum injeksi yang diletakkan pada keempat telapak kaki tikus.
- e. Melakukan insisi pada daerah thoraks.
- f. Dinding perut dibuka dengan pinset dan gunting, lalu membuka rongga peritoneum dengan hati-hati dengan sayatan pada garis tengah dilanjutkan ke samping kiri dan kanan lalu ke sisi atas dan bawah kemudian membuka diafragma. Kulit yang menutupi bagian dada dibuka dengan insisi dari *Prosesus Xyloideus* (px) kearah leher dan ditarik ke samping.
- g. Ovarium diambil dengan memotong jaringan-jaringan yang mengikatnya.
- h. Ovarium dibersihkan dari ligamen dan darah yang melekat dengan menggunakan larutan NaCl 0,9 % dan ditiriskan pada kertas saring.
- i. Setelah organ mengering dan tidak ada lagi air, ovarium ditimbang menggunakan timbangan analitik.
- j. Ovarium selanjutnya dimasukkan ke dalam wadah yang berisi larutan fiksasi buffer formalin 10% direndam selama 12-24 jam.

- k. Ovarium akan digunakan untuk preparat imunohistokimia dan *Hematoksillin Eosin (HE)*.
- l. Setelah pengambilan organ tikus dikubur dengan kedalaman tanah lebih dari 1 meter untuk menghindari adanya bau atau terkoreknya tanah oleh hewan pemangsa. Tikus dikubur di daerah yang jauh dari pemukiman untuk menghindari adanya pencemaran lingkungan.

4.7.9 Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi Ovarium

- a. Proses pemotongan jaringan makroskopik
Setelah gross hasil bedah dimasukkan ke larutan *Neutral Buffer* (fiksasi) semalam, jaringan dipotong secara transversal dengan ketebalan 2-3 milimeter kemudian dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti lalu dimasukkan ke dalam larutan *Neutral Buffer* sebelum diproses atau dimasukkan ke alat *Tissue Tex Processor* untuk diproses menggunakan alat/mesin *Tissue Tex Processor* selama 90 menit sampai alarm berbunyi.
- b. Proses pengeblokan dan pemotongan jaringan
Jaringan diangkat dari mesin *Tissue Tex Processor*, lalu jaringan diblok dengan paraffin sesuai kode jaringan. Kemudian jaringan dipotong dengan alat mikrotome dengan ketebalan 3-5 mikron.
- c. Proses deparafinisasi
Setelah dipotong dengan tebal ukuran 3-5 mikron, diletakkan dalam oven selama 30 menit dengan suhu 70-80 °C kemudian dimasukkan ke dalam 2 wadah berisi larutan xylol masing - masing 20 menit. Setelah itu dimasukkan ke 4 wadah berisi larutan etanol dengan konsentrasi 100 %, 90 %, 80 % dan 70 % masing-masing wadah lamanya 3 menit (hidrasi) dan terakhir diberikan air mengalir selama 15 menit.

4.7.10 Prosedur Pewarnaan *Hematoksilin Eosin* untuk Mengetahui Jumlah Folikel Antral

a. Hidrasi

Memasukkan kaca obyek ke dalam etanol mulai dari alkohol 100% selama 4 menit, alkohol 96% selama 3 menit, alkohol 90% selama 3 menit, alkohol 80% selama 2 menit dan alkohol 70% selama 2 menit. Kaca obyek kemudian di cuci dibawah air mengalir selama 10 menit

b. Pengecatan

Slide direndam dalam cat utama *Mayer's Hematoksilin* selama 5 menit dilanjutkan dengan *Harris's Hematoksilin* selama 2 menit.

c. Pengecatan dengan cat pembanding

Pemberian cat pembanding Eosin 1% selama 3-5 menit

d. Rehidrasi

Memasukkan kaca obyek ke dalam etanol mulai dari alkohol 70% selama 2 menit, alkohol 90% selama 3 menit, alkohol 96 % selama 4 menit dan alkohol 100% selama 5 menit.

e. *Clearing*

Kaca obyek dimasukkan ke dalam xylol sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

f. *Mounting*

Slide ditetesi entelan lalu ditutupi *cover glass*

4.7.11 Prosedur Pemeriksaan Ekspresi Bcl-2 dengan Teknik Imunohistokimia

Slide histopatologi yang sudah disiapkan untuk pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi Bcl-2, prosedur dilakukan berdasarkan R&D dengan langkah – langkah sebagai berikut :

1. Persiapan jaringan

Slide yang digunakan sudah di beri sayatan jaringan ovarium yang telah disiapkan pada proses histopatologi, slide sudah dipanaskan pada *hot plate* dengan suhu 60° C selama 45 menit.

Langkah – langkah selanjutnya adalah :

- a. Deparafinisasi dilakukan dengan dengan tujuan untuk melepaskan paraffin yang melekat pada preparat dengan cara mencuci kaca obyek sebanyak 3 kali dalam *xylol* selama 3 menit
- b. Rehidrasi dengan cara kaca obyek dicuci dalam alkohol 100% sebanyak 3 kali dalam waktu 3 menit, selanjutnya dicuci dengan alkohol 95% sebanyak 2 kali dalam waktu 3 menit, dicuci dengan alkohol 80% dalam waktu 3 menit dan terakhir dicuci dengan air mengalir dalam waktu 5 menit
- c. Antigen *retrieval* dengan prosedur direbus dengan *sodium sitrat buffer* 0,01, pH 6,0 dengan suhu 99 – 100° C dalam waktu 15 – 20 menit. Selanjutnya dicuci dengan Tris Buffered Saline with Tween (TBST) dalam waktu 5 menit.

2. Pewarnaan Imunohistokimia

Pada tahapan dilakukan dengan langkah – langkah sebagai berikut :

- a. Membersihkan pinggir kaca obyek dengan tissue tanpa mengenai jaringan, kemudian melakukan bloking peroksidase endogen untuk mengurangi bias dengan menutup protein yang bukan merupakan protein target. Ini dilakukan dengan cara :
 - 1) Menetesi H₂O₂ 3% dengan alkohol selama 20 menit
 - 2) Menginkubasi dengan suhu selama 15 menit
 - 3) Mencuci kaca obyek dengan larutan PBS 1 x 5 menit, 2 x 2 menit.

- b. Melakukan *blocking unspesifik* protein dengan cara :
- 1) Menetesi kaca obyek dengan background sniper lalu menginkubasi dalam suhu ruang selama 15 menit.
 - 2) Mencuci kaca obyek dengan larutan PBS 1 x 5 menit, 2 x 2 menit.
- c. Melakukan inkubasi antibodi primer dengan cara
- 1) Meneteskan antibodi primer yang dilarutkan dalam buffer PBS dengan konsentrasi 0,5 mg / ml.
 - 2) Menginkubasi *overnight* pada suhu 4^o C.
 - 3) Mengeluarkan dari tempat inkubasi ke dalam suhu ruang.
 - 4) Mencuci kaca obyek dengan larutan PBS 1 x 5 menit, 2 x 2 menit
- d. Melakukan inkubasi antibodi sekunder dengan cara :
- 1) Meneteskan antibodi sekunder lalu diinkubasi selama 60 menit dalam suhu ruang. Kaca obyek diletakkan di dalam chamber yang bagian bawahnya sudah diisi tisu dan *aquadest* agar tetap lembab dan agar proses pewarnaan baik dan tidak terjadi penguapan
 - 2) Mencuci kaca obyek dengan larutan PBS 1 x 5 menit, 2 x 2 menit
- e. Menginkubasi SA – HRP dengan cara
- 1) Meneteskan SA- HRP lalu dilakukan inkubasi dalam suhu ruang selama 40 menit.
 - 2) Mencuci kaca obyek dengan larutan PBS 1 x 5 menit, 2 x 2 menit.
 - 3) Bilas dengan menggunakan *aquadest* sebanyak 3 – 4 kali.
- f. Aplikasi kromagen DAB untuk memunculkan warna dengan cara :
- 1) Menetesi dengan DAB (DAB kromagen : DAB buffer = 1 : 40)
 - 2) Menginkubasi dalam suhu ruang selama 3 – 10 menit
 - 3) Bilas dengan *aquadest* 3 x 5 menit

3. *Counterstaining*

Menggunakan *Mayer's Hematoksilin* untuk memberi warna yang tidak terwarnai sebelumnya dengan cara :

- a. Mengencerkan *Mayer's Hematoksilin* dengan air bersih dengan perbandingan 1:2 atau 1:10
 - b. Meneteskan *Mayer's Hematoksilin* lalu diinkubasi selama 1 menit. Setelah itu teteskan 3 tetes *aquadest* di atas kaca obyek yang sudah diberi *Mayer's* , diinkubasi lagi selama 5 menit dalam suhu ruang.
 - c. Dibilas dengan *aquadest*
4. Menggunakan entellan untuk melindungi sampel sebelum diamati dengan cara meneteskan entellan pada kaca obyek lalu dikeringkan. Setelah itu menutup kaca obyek dengan *cover glass*.

4.7.12 Pembacaan Jumlah Folikel Antral

Dilakukan penghitungan jumlah folikel antral dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada seluruh lapang pandang ovarium (Bancroft, 2008). Ciri folikel antral memiliki lapisan lebih dari satu lapis sel, ada sel granulosa, sel teka dan terbentuknya rongga yang berisi cairan folikuli.

4.7.13 Pengamatan Ekspresi Bcl-2 di ovarium

Ekspresi Bcl-2 diamati dengan menggunakan HPF (*High Power Field*) dengan pembesaran 1000x diamati di bawah mikroskop cahaya pada 20 lapang pandang. Pulasan imunohistokimia dinilai hasilnya tidak ada (negatif) jika tidak terdapat sel granulosa yang intinya berwarna coklat dan dinilai hasilnya ada (positif) jika ditemukan sel granulosa yang intinya berwarna coklat pada inti sel. Dianalisa dengan imunoratio dengan menggunakan aplikasi Fiji.

4.8 Teknik Analisa Data

Pada penelitian ini teknik analisa data dilakukan dengan menggunakan bantuan SPSS for Windows 23.0.

4.8.1 Uji Normalitas Data

Sebelum uji statistik dilakukan, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas data apakah data berdistribusi normal atau tidak . Jumlah sampel pada penelitian ini < 50 sampel, maka uji normalitas yang digunakan adalah *Shapiro Wilk* dalam uji ini, pengambilan keputusan dengan melihat nilai probabilitas kesalahan empirik pada nilai Sig atau dikenal dengan *p-value*. Jika nilai Sig atau *p-value* menunjukkan nilai lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$, maka data tersebut berdistribusi normal, sehingga uji statistik parametrik dapat digunakan. Akan tetapi jika nilai Sig atau *p-value* menunjukkan nilai kurang dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$, maka data tersebut tidak berdistribusi normal, sehingga uji statistik parametrik tidak dapat digunakan. (Santoso, 2005).

4.8.2 Uji One Way Anova

Uji *One Way Anova* adalah uji statistik parametrik yang digunakan untuk membandingkan rerata variabel terukur antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Tujuan uji statistik ini adalah untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pemberian larutan cypermethrin peroral pada tikus (*Rattus norvegicus*) betina galur wistar. Jika pada Uji *One Way Anova* ini menghasilkan kesimpulan H_0 ditolak atau ada perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda yaitu Uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*). Tujuan uji LSD ini adalah untuk menemukan berapa dosis cypermethrin yang paling berpengaruh terhadap ekspresi Bcl-2 dan jumlah folikel antral tikus (*Rattus norvegicus*) betina galur Wistar (Santoso, 2005)

4.8.3 Uji Korelasi Pearson

Uji korelasi Pearson bilamana kenaikan nilai variabel X selalu disertai dengan dengan kenaikan variabel Y dan turunnya nilai variabel X juga diikuti oleh turunnya nilai Y maka ini disebut hubungan positif. Akan tetapi sebaliknya bilamana kenaikan nilai variabel X selalu diikuti oleh penurunan nilai variabel Y atau sebaliknya maka hubungan variabel X dan Y adalah hubungan negatif. Koefisien korelasi berkisar antara 0,00 dan +1,00

Uji korelasi tidak lain adalah menguji ada atau tidak adanya tingkat keeratan hubungan dua variabel terukur (minimal berskala interval), yaitu korelasi antara ekspresi BCL-2 dan jumlah folikel. Dalam penelitian ini digunakan uji korelasi *Pearson* jika data terdistribusi normal, tetapi jika tidak maka digunakan uji *Spearman's rho*. Kriteria keputusan berdasarkan nilai Sig atau *p-value*, jika *p-value* > $\alpha = 0.05$ maka disimpulkan tidak ada korelasi yang bermakna antar dua variabel, dan jika *p-value* < $\alpha = 0.05$ maka disimpulkan ada korelasi yang bermakna antar dua variabel.

Selanjutnya tingkat keeratan hubungan (koefisien korelasi/KK) dapat diartikan ke dalam tujuh tingkatan (Hasan, 2012) sebagai berikut:

KK = 0, tidak ada korelasi.

$0 < KK \leq 0.20$, korelasi sangat rendah/lemah tapi pasti.

$0.20 < KK \leq 0.40$, korelasi rendah/lemah tapi pasti.

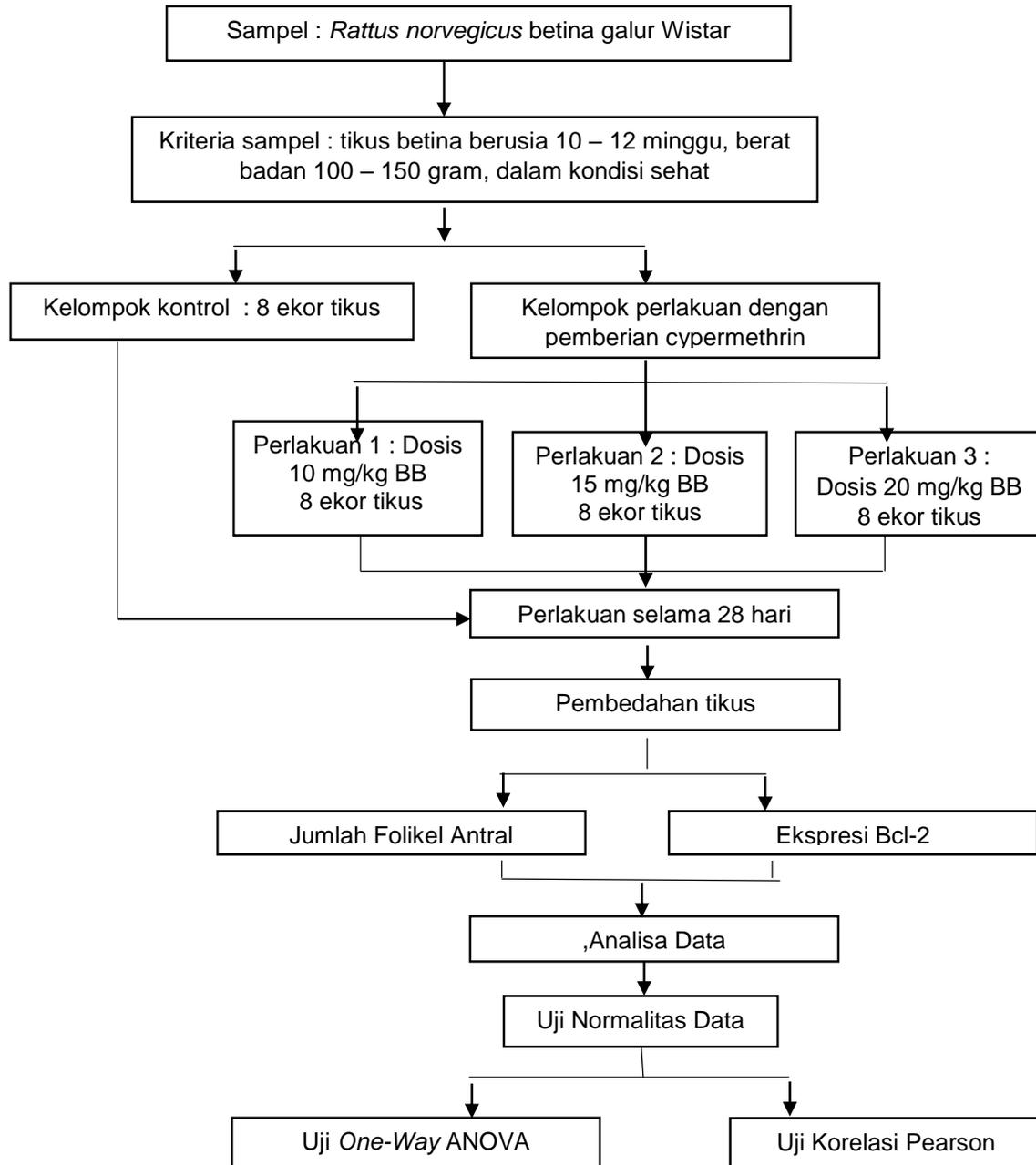
$0.40 < KK \leq 0.70$, korelasi yang cukup berarti.

$0.70 < KK \leq 0.90$, korelasi yang tinggi; kuat.

$0.90 < KK < 1.00$, korelasi sangat tinggi; kuat sekali, dapat diandalkan.

KK = 1, korelasi sempurna.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian