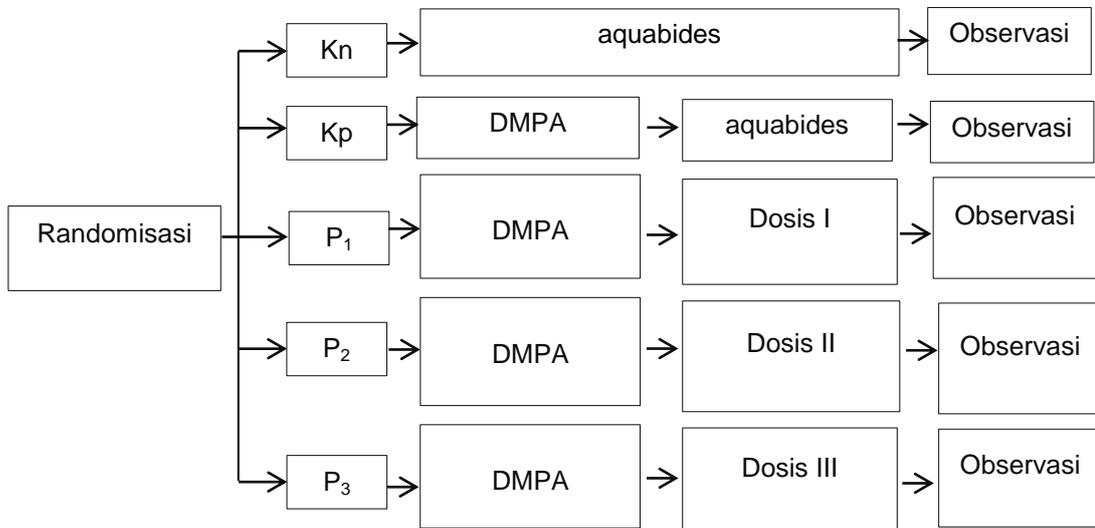


BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan *true experimental* dan pendekatan *post test only control group design*. Dalam desain ini untuk penentuan sampel dilakukan secara random. Selanjutnya kelompok kontrol negatif disuntik aquabides dan diberi aquabides secara oral, kelompok kontrol positif dipapar DMPA dan diberi aquabides secara oral, kelompok perlakuan 1 dipapar DMPA dan ekstrak air kelor dosis 100 mg/kg BB/hari, kelompok perlakuan 2 dipapar DMPA dan ekstrak air kelor dosis 150 mg/kg BB/hari dan kelompok perlakuan 3 dipapar DMPA dan ekstrak air kelor dengan dosis 200 mg/kg BB/hari.



Gambar 4.1 Skema Desain Penelitian

Keterangan :
Kn : Kelompok kontrol negatif
Kp : Kelompok kontrol positif
P₁ : Kelompok perlakuan 1
P₂ : Kelompok perlakuan 2
P₃ : Kelompok perlakuan 3

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Tempat Penelitian

- 1) Di Matera medika Kota Batu, Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur untuk memperoleh bahan alam daun kelor yang berbentuk simplisia
- 2) Di Laboratorium Fisiologi Hewan untuk melakukan *freeze dryer* ekstrak air daun kelor.
- 3) Di Laboratorium farmasi untuk mengetahui kandungan fitokimia ekstrak air daun kelor seperti polifenol.
- 4) Di Laboratorium MIPA kimia untuk mengetahui kadar fenol ekstrak air daun kelor.
- 5) Di Laboratorium analisis instrumentasi POLINEMA untuk mengetahui total flavonoid dengan QuE (quercetin equivalent) ekstrak air daun kelor.
- 6) Di laboratorium parasitologi untuk pemeliharaan hewan coba dan eksekusi organ endometrium dilakukan
- 7) Di Laboratorium Patologi Anatomi untuk pembuatan preparat histologi
- 8) Di Laboratorium Biomedik untuk pemeriksaan SOD dan Indeks Apoptosis
Tempat pemeriksaan SOD dan indeks apoptosis dilakukan

4.2.2 Waktu Penelitian

3 bulan terhitung sejak April sampai juli 2017

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Kriteria Pengambilan Sampel

Tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*) sebagai hewan coba, sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

4.3.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Tikus usia 9-12 minggu dengan berat 120-150 gram, jenis kelamin betina, kondisi sehat dan bergerak aktif masuk dalam kriteria penelitian sedangkan apabila tikus tampak sakit sebelum/ selama perlakuan dan hewan coba mati saat penelitian berlangsung akan dikeluarkan..

4.3.3 Besar sampel

Dalam solimun (2001) disebutkan, rumus besar sampel ditentukan atas dasar banyaknya pengulangan pada kelompok perlakuan sebagai berikut :

Rumus :

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

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

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan pada tiap kelompok perlakuan

Besar replikasi dalam penelitian ini adalah 6 tikus, sehingga besar sampel yang digunakan adalah 30 tikus.

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

Variabel independen : pemberian ekstrak air daun kelor, sedangkan variabel dependen : kadar SOD dan indeks apoptosis sel di endometrium.

4.4.2 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Cara Ukur	Skala Data
1	Independent			
	a. Ekstrak air daun kelor	Simplisia Daun kelor diperoleh dari materia medika Kota Batu, Malang. Pemberian ekstrak air daun kelor pada berbagai dosis yaitu dosis 100, 150 dan 200 mg/kg BB/hari dan diberikan secara oral dengan menggunakan sonde pada tikus selama 28 hari	Dengan cara menimbang dan melarutkan ekstrak air daun kelor (Lamau <i>et al.</i> , 2016)	Rasio
2	Dependen			
	a. SOD	Besarnya konsentrasi enzim SOD sebagai salah satu enzim antioksidan endogen yang diukur dari sampel uterus tikus wistar yang diterminasi setelah 28 hari perlakuan dengan injeksi DMPA dan pemberian ekstrak air daun kelor.	Colorymetry dengan membandingkan Optikal Density (OD) sampel dengan kurva standar. Hasil yang didapatkan pada kadar SOD dinyatakan dalam U/mL (Cayman, 2014)	Rasio
	b. Indeks Apoptosis	Pengamatan apoptosis pada jaringan endometrium, Jaringan yang apoptosis dihitung dengan program immunoratio pembesaran 1000 dengan 20 lapang pandang	Immunohistokimia (Roche, 2004)	Rasio

4.5 Aklimatisasi dan Pemeliharaan tikus

Aklimatisasi tikus dilakukan selama 1 minggu dengan tujuan mengkondisikan tikus dengan suasana laboratorium dan menghilangkan stress. Pada waktu aklimatisasi tikus diberikan makan dan minum dengan pakan standar diberikan sebanyak 40 gram/ hari/ ekor satu kali sehari jam 16.00 WIB. Tikus ditempatkan pada kandang dengan suhu kamar 20-25⁰C yang tampak dari luar dengan ukuran 20 cm x 30 cm x 40 cm yang telah dialasi sekam padi setebal 0,5-1 cm dan setiap 2 hari sekali sekam diganti.

4.6 Prosedur Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor

4.6.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu padatan atau cairan dengan bantuan pelarut.

4.6.2 Bahan

Simplisia daun kelor yang diperoleh dari Materia medika Kota Batu, Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur.

4.6.3 Alat

Kompor, panci, air, corong gelas, gelas ukur, timbangan, kain saring, tempat simplisia daun kelor dan botol tempat ekstrak air daun kelor

4.6.4 Prosedur Ekstraksi Air Daun Kelor

Pembuatan ekstraksi air daun kelor dilakukan oleh peneliti dengan menyiapkan 170 gram simplisia daun kelor direndam pada 1,7 liter air 70⁰ C selama 1 jam kemudian disaring. Kemudian dilakukan *freeze dryer* pada ekstrak air daun kelor di Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Brawijaya.

4.6.5 Pembuatan Sediaan Ekstrak Air Daun Kelor

Pembuatan sediaan ekstrak air daun kelor didasarkan dengan berat badan tikus rata-rata yang ditimbang setiap seminggu sekali. Jika Berat Badan tikus 150 mg, maka sediaan ekstrak air daun kelor :

- 1) Dosis I = 100 mg $\rightarrow 100 \text{ mg} \times 150 \text{ gram} / 1000 = 15 \text{ mg}$
- 2) Dosis II = 150 mg $\rightarrow 150 \text{ mg} \times 150 \text{ gram} / 1000 = 22,5 \text{ mg}$
- 3) Dosis III = 200 mg $\rightarrow 200 \text{ mg} \times 150 \text{ gram} / 1000 = 30 \text{ mg}$

Membuat larutan stok 50 mg/ml dengan menimbang 5 gram ekstrak air daun kelor dilarutkan dalam 100 ml aquabides. Selanjutnya membuat larutan dengan konsentrasi sesuai dengan kebutuhan yaitu 15 mg/ ml, 22,5 mg/ml, 30 mg/ ml.

- 1) Untuk membuat ekstrak air daun kelor dosis I = konsentrasi 15 mg/ ml :
 $10 \times 15 / 50 = 3 \text{ ml}$ stok dengan ditambah 7 ml aquades = 10 ml. 1 tikus diberi 1 ml.
- 2) Untuk membuat ekstrak air daun kelor dosis II = konsentrasi 22,5 mg/ml :
 $10 \times 22,5 / 50 = 4,5 \text{ ml}$ stok dengan ditambah 5,5 ml aquades = 10 ml. 1 tikus diberi 1 ml.
- 3) Untuk membuat ekstrak air daun kelor dosis III = konsentrasi 30 mg/ ml :
 $10 \times 30 / 50 = 6 \text{ ml}$ stok dengan ditambah 4 ml aquades = 10 ml. 1 tikus diberi 1 ml.

4.7 Injeksi DMPA

DMPA dengan dosis 150 mg (3 ml) diencerkan dengan aquabidest sebanyak 7 ml, diaduk agar homogen. Lalu diambil 0,2 ml (2,7 mg) untuk diinjeksikan pada masing-masing kelompok perlakuan (kontrol positif, perlakuan 1,2,3) (Susilawati *et al.*, 2015) . DMPA diberikan pada awal minggu bersamaan dengan pemberian ekstrak air daun kelor.

4.8 **Prosedur terminasi**

Tikus diterminasi dengan cara diinjeksikan ketamin sebanyak 80 mg/kg BB dan ditunggu beberapa menit sampai tikus benar-benar mati (tidak bergerak lagi).

4.9 **Pengambilan Organ Uterus**

4.9.1 **Bahan dan Alat :**

Bahan : Gunting, pinset, NaCl 0,9 %, PBS pH 7,4 dan formalin 10%

4.9.2 **Prosedur Pengambilan Organ Uterus**

- 1) Meletakkan tikus yang sudah mati diatas papan dengan perut menghadap ke atas (Terfiksasi dengan baik). Tikus ditempatkan pada atas papan dengan menggunakan jarum pentul yang ditancapkan pada keempat telapak kaki.
- 2) Membuka dinding perut dengan menggunakan gunting dan pinset secara hati-hati dengan sayatan pada garis tengah dilanjutkan kesamping kiri dan kanan pada sisi atas dan bawah dan diafragma dibuka. Setelah itu uterus dibuka dengan hati-hati dengan cara menggunting tepat pada bagian isthmus tuba fallopi kiri dan kanan dan pada bagian bawah (batas antara servik dan uterus)
- 3) Kemudian uterus dibersihkan dari seluruh ligamen yang melekat. Selanjutnya uterus dibersihkan dari darah menggunakan aquabides tiriskan organ menggunakan kertas saring dengan satu kali tekanan.
- 4) Setelah air pada organ mulai mengering, uterus dipisahkan antara tandur uterus kanan dan kiri.

- 5) Kemudian masukkan tandur uterus kanan kedalam klip plastik kemudian ditimbang untuk selanjutnya menguji kadar SOD dan masukkan tandur uterus kiri dalam botol yang berisi *fixative buffer formalin* 10% dan direndam selama 12-24 jam untuk menguji indeks apoptosis.
- 6) Bagian tandur uterus kanan siap untuk dilakukan uji kadar SOD dan bagian tandur uterus kiri diproses menjadi preparat di laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya yang selanjutnya untuk menguji indeks apoptosis.
- 7) Bangkai tikus dikubur dengan kedalaman 0,5 meter.

4.10 Prosedur SOD

4.10.1 Persiapan Bahan dan Alat

Superoxide Dismutase Assay Kit, 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, sukrosa dan sentrifuse

4.10.2 Menghomogenkan Jaringan

- 1) Jaringan dibilas dengan *phosphate buffered saline* (PBS) dengan pH 7.4) untuk menghilangkan sel darah merah, endapan atau gumpalan.
- 2) Homogenisasi dalam 5-10 ml/ gram jaringan pada buffer HEPES (dingin) konsentrasi 20 mM. pH 7,2 yang mengandung 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, dan 70 mM sukrosa.
- 3) Lalu disentrifus selama 5 menit dengan 1500xg pada 4⁰C.
- 4) Supernatan diambil untuk pengujian dan apabila supernatan tidak dilakukan pengujian segera maka disimpan dalam -80⁰C. Sampel akan tetap stabil dalam waktu 1 bulan.

4.10.3 Reagen Preparation

1) Assay Buffer

8 ml assay buffer 10x + 27 ml HPLC grade water



30 ml diluted assay buffer

2) Sampel Buffer

2 ml sampel buffer 10x + 18 ml HPLC grade water



20 ml diluted sampel buffer

3) Radical detector

50 ml stock + 19, 95 ml diluted assay buffer



20 ml diluted radical detector

4) SOD standart

20 µl SOD standart + 1,98 ml sampel buffer



2 ml SOD stock solution

5) Xantine Oxidase

50 ml stock + 1, 95 ml sampel buffer



2 ml diluted xantine oxidase

4.10.4 SOD Asssay

- 1) Untuk membuat standard Well SOD tambahkan 200 µl Radikal *Detector* yang telah diencekan dan 10 µl pada *standard* (tabung A-G) pada tiap well.
- 2) Untuk membuat sampel well, tambahkan 200 µl Radikal Detector yang telah diencerkan dan 10 µl pada sampel tiap well.

- 3) Reaksi dimulai dengan menambahkan 20 µl *Xanthine Oxidase* yang telah diencerkan untuk semua well yang digunakan. Pastikan untuk mencatat waktu yang tepat pada saat memulai dan menambahkan *Xanthine Oxidase* secepat mungkin.
- 4) Kocok 96 well *plate* dengan hati-hati selama beberapa detik dalam mencampur. Tutup dengan penutup *plate*.
- 5) Inkubasi *plate* pada *shaker* selama 20 menit pada suhu kamar. Baca absorbansi pada 440-460 nm menggunakan *plate reader*.

4.11 Posedur Pengerjaan Preparat

- 1) Proses pemotongan jaringan berupa makross
Jaringan atau Spesimen Penelitian harus sudah terfiksasi dengan formalin 10 % atau dengan bafer formalin 10 % minimal selama 7 jam sebelum dilakukan proses pengerjaan berikutnya kemudian jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan lokasi yang akan di teliti. Jaringan di potong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter kemudian di masukan kekaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti. Jaringan kemudian diproses dengan alat Automatik Tissue Tex Prosesor atau dengan cara manual. Standar di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB menggunakan Automatik Tissue Tex Prosesor selama 90 Menit dan alarm bunyi tanda selesai.
- 2) Proses pengeblokan dan pemotongan jaringan
Jaringan di angkat dari mesin Tissue Tex Prosesor, kemudian jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan dan jaringan di potong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron.
- 3) Proses deparafinisasi
Setelah di sayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron, di taruh dalam oven selama 30 Menit dengan suhu panas 70-80

drajat , kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan sylol masing-masing 20 menit, setelah itu di masukan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (Hidrasi), dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit.

4.12 Pemeriksaan Indeks Apoptosis

4.12.1 Kit, Bahan dan Alat

Kit TUNNEL Apoptosis, *Xylene* dan etanol, PBS dan Pro K

4.12.2 Prosedur Pemeriksaan Indeks Apoptosis

1) Deparafinasi

Slide dipanaskan pada suhu 60°C selama 60 menit. Kemudian direndam dalam larutan-larutan dibawah ini secara berurutan : xilol (2 x 10 menit), etanol absolut (2 x 10 menit), etanol 90 % (1 x 5 menit), etanol 80 % (1 x 5 menit), etanol 70% (1 x 5 menit) dan aquades steril (3 x 5 menit).

2) Antigen Retrieval dengan Buffer Sitrat : rendam slide kemudian keluarkan dan cuci slide

3) Immunohistokimia

a. Cuci PBS 3 X 5 menit

b. Berikan Pro-K dalam Tris HCL PH 7,4 selama 25 menit dengan suhu 37°C

c. Cuci PBS 3 x 5 menit

d. Berikan *Tunnel reaction mixture*

e. Inkubasi 60 menit dalam suhu 37°C dalam gelap.

f. Cuci PBS 3 x 5 menit

g. Berikan converter POD 50 µl selama 30 menit dalam suhu 37°C

h. Cuci PBS 3 x 5 menit

i. DAB substrat 3 menit

- j. Cuci aquabides
- k. Berikan mayer 2 menit
- l. *Maunting*

4.13 Analisis Data

Teknik analisa data yang dilakukan yaitu uji normalitas data sampel dengan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50. Uji homogenitas ragam, menggunakan uji *Levene*. Uji statistik yang digunakan untuk uji beda adalah Anova One Way (uji F) apabila data terdistribusi normal dan homogen atau uji Kruskal Wallis apabila data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen

4.13.1 Uji Prasyarat Parametrik

Data sampel dari variabel terukur diuji terlebih dahulu apakah data terdistribusi normal dan homogen. Uji normalitas data dalam penelitian ini digunakan uji *Shapiro-Wilk* jika nilai Sig menunjukkan nilai yang lebih besar dari taraf signifikan $\alpha = 0,05$ (Santoso, 2005). Uji homogenitas ragam yang digunakan adalah uji *Levene*. Jika nilai Sig atau *p-value* menunjukkan nilai yang lebih besar 0,05, maka disimpulkan data homogen sehingga dapat dilakukan uji parametrik (Dahlan, 2015).

4.13.2 Uji Anova One Way

Digunakan untuk membandingkan rerata variabel terukur antara K+ dengan P1,P2, P3. Analisis ini dilakukan yaitu terhadap data kadar SOD dan indeks apoptosis. Tujuannya untuk mengetahui ada atau tidak ada perbedaan pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor terhadap kadar SOD dan indeks apoptosis pada endometrium tikus wistar yang dipapar DMPA. Jika pada uji *Anova One Way* ini menghasilkan kesimpulan ada perbedaan pengaruh signifikan, maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda yaitu *Least Significant Difference/ LSD* (Steel dan Torrie, 1995). Dengan tujuan untuk

menemukan dosis ekstrak air daun kelor yang paling berpengaruh terhadap kadar SOD dan indeks apoptosis pada tikus wistar.

4.13.3 Uji *Pearson Product Moment*

Uji *Pearson Product Moment* adalah uji korelasi yang digunakan pada data penelitian yang berdistribusi normal dan homogen. Kriteria pengambilan keputusannya adalah apabila nilai signifikansi $\leq 0,05$ artinya ada hubungan antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor dengan kadar SOD dan indeks apoptosis pada endometrium tikus wistar yang dipapar DMPA. Untuk uji korelasi, setelah dilakukan uji statistik, selain dilihat nilai signifikansi, maka perlu dilihat koefisien korelasi untuk melihat kekuatan hubungan antara kedua variabel serta ditentukan arah hubungannya. Nilai korelasi berkisar antara 0 sampai dengan 1, dan dapat bernilai positif maupun negatif.

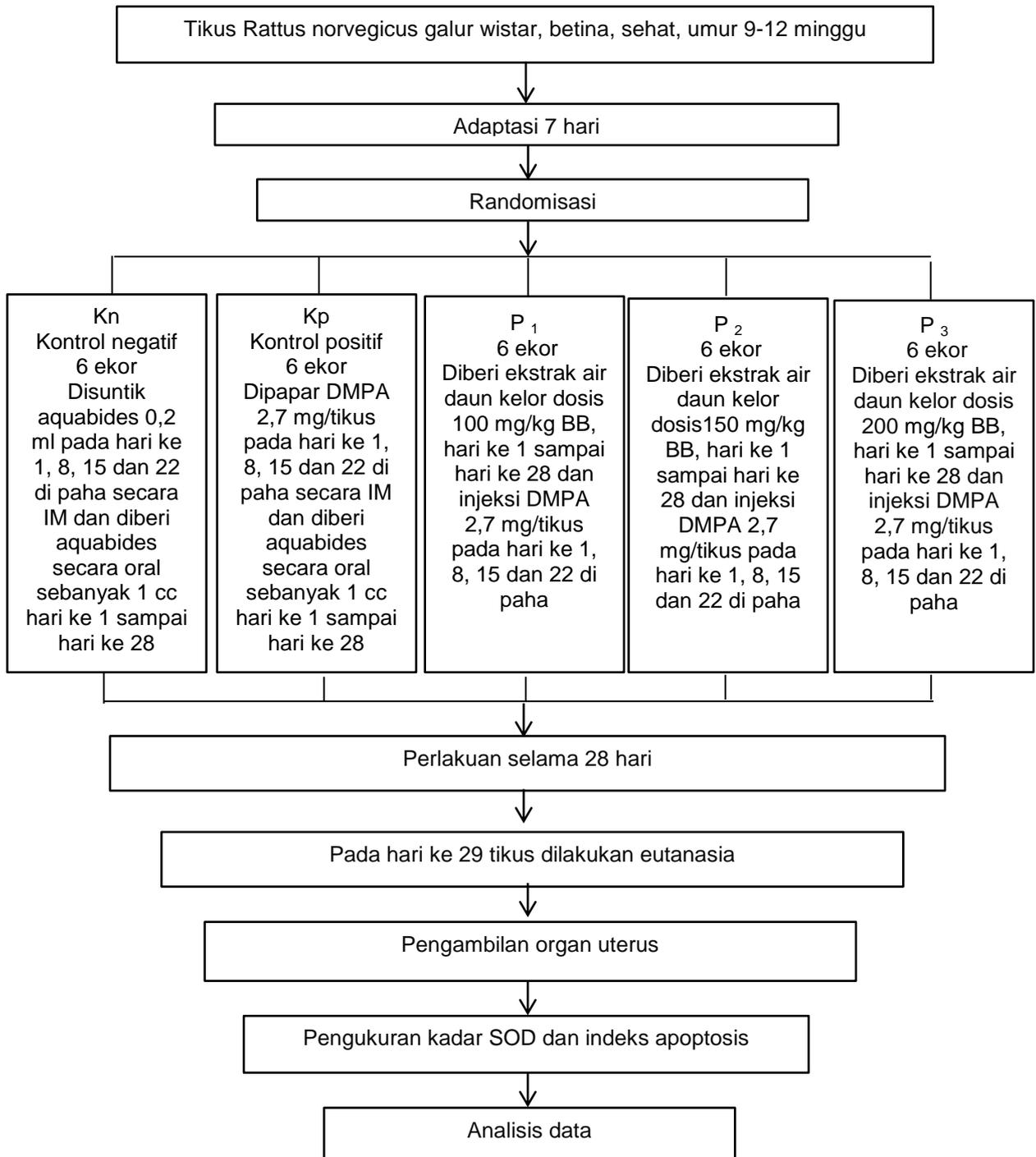
Kesimpulan diambil dengan kriteria sebagai berikut :

- 1) Korelasi bernilai positif (+) berarti terdapat hubungan positif, yang artinya penambahan dosis ekstrak air daun kelor akan diikuti dengan penambahan kadar SOD maupun indeks apoptosis.
- 2) Korelasi bernilai negatif (-) berarti terdapat hubungan negatif, yang artinya penambahan dosis ekstrak air daun kelor akan diikuti dengan penurunan kadar SOD maupun indeks apoptosis .

Adapun kekuatan hubungan antara variabel digunakan kriteria sebagai berikut :

Adapun kekuatan hubungan antara variabel digunakan kriteria koefisien korelasi dan nilai korelasi 0 menunjukkan tidak ada korelasi, $0 < 0,2$ = korelasi sangat lemah, $0,2 < 0,4$ = korelasi lemah, $0,4 < 0,6$ = korelasi sedang, $0,6 < 0,8$ = Korelasi kuat, $0,8 - 1$ = korelasi sangat kuat (Dahlan, 2015).

4.14 Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.2 Bagan Alur Penelitian

Keterangan :

P_{1,2,3} : Kelompok perlakuan