

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Jenis dan Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian experimental yaitu *true experimen* yang didesain mengikuti Rancangan Acak Lengkap dengan rancangan penelitian *post test only control group design* (Zainuddin, 2011).

Penelitian eksperimental ini digunakan untuk menentukan perubahan kadar SOD dan apoptosis folikel ovarium pada tikus setelah diberikan pajanan MSG sebesar 0.7 mg/tikus kemudian diberikan ekstrak teh hijau dengan dosis 0.7 mg/tikus 1.4 mg/tikus, dan 2.8 mg/tikus. Perlakuan pada tikus putih betina selama 30 hari.

#### **4.2. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Farmakologi, Laboratorim Patologi Anatomi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu dan pelaksanaan penelitian akan di mulai dari Bulan Juli 2017 sampai dengan Agustus 2017 rincian : selama 7 hari aklimatisasi, 30 hari waktu untuk memberi perlakuan dan waktu selanjutnya digunakan untuk menganalisa data.

#### **4.3. Subyek Penelitian**

Penelitian ini menggunakan sampel berupa 25 tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*) betina. Tikus putih diperoleh dari laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Kriteria Inklusi :

- a. Tikus strain wistar
- b. Jenis kelamin betina

- c. Usia 2 bulan
- d. Berat badan 100 – 200 gram
- e. Kondisi sehat dan tidak tampak kecacatan secara anatomi

Besar subyek penelitian dalam setiap kelompok dihitung berdasarkan rumus Hanafiah (2012)

Rumus :

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

t : jumlah perlakuan

r : jumlah ulangan

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 19 : 4$$

$$r \geq 4,75 \text{ (dibulatkan 5)}$$

Didapatkan jumlah subyek hewan coba untuk tiap kelompok adalah sebanyak 5 ekor tikus.

**Tabel. 4.1. Subyek Penelitian**

Kelompok	Perlakuan		Lama Perlakuan
	MSG (Mg/g)	Ekstraksi Maserasi Teh Hijau (mg/ml)	
I	-	-	30 Hari
II	0.7 mg/tikus		30 Hari
III	0.7 mg/tikus	0.7 mg/tikus	30 Hari
IV	0.7 mg/tikus	1.4 mg/tikus	30 Hari
V	0.7 mg/tikus	2.8 mg/tikus	30 Hari

Keterangan : Pembagian kelompok perlakuan pada tikus putih

#### 4.4. Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang diamati atau diukur meliputi :

- a. Variabel Bebas (*Independent*)

Ekstrak maserasi teh hijau

b. Variabel Terikat (*Dependent*)

SOD ovarium dan Apoptosis sel granulosa folikel ovarium

4.5. Definisi Operasional

Tabel 4.2 Definisi Operasional Penelitian

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Skala Pengukuran
Ekstrak Maserasi Teh Hijau	Daun teh kering yang diperoleh dari Perkebunan Teh Tambi Wonosobo, Jawa Tengah. Diproses dengan metode maserasi dengan pelarut ethanol 96% di Laboratorium Farmakologi FKUB Malang. Hasil berupa ekstrak kental dan diberikan secara oral dengan menggunakan sonde pada tikus setiap hari selama 30 hari.	Timbangan analitik. Ekstrak teh hijau dibagi kedalam 3 dosis yaitu: 0,7 mg/ml 1,4 mg/ml 2,8 mg/ml (Mahmood <i>et al</i> , 2015).	Rasio
SOD Ovarium	Besarnya enzim SOD yang berperan sebagai enzim endogen antioksidan, pada ovarium <i>Rattus norvegicus</i> yang diterminasi.	Kadar SOD yang terdapat di jaringan ovarium diukur menggunakan SOD <i>assay kit</i> dengan metode Elisa	Rasio
Apoptosis Ovarium	Persentase sel granulosa folikel ovarium yang mengalami apoptosis/ jumlah total sel granulosa yang diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x sebanyak 20 lapang pandang. Sel yang mengalami fragmentasi DNA akan tampak berwarna coklat tua pada bagian inti sel.	Pemeriksaan apoptosis dengan Tunnel menggunakan <i>In Situ Cell Death Detection Kit</i> , POD dengan metode imunohistokimia	Rasio

#### **4.6. Metode Penelitian**

##### **4.6.1. Pembuatan Ekstrak Maserasi Teh Hijau**

1. Bahan:

Daun teh hijau kering dalam bentuk kemasaaan (100 gr), etanol 96% untuk pelarut.

2. Alat Untuk ekstrak teh hijau:

Timbangan analitik, seperangkat alat ekstraksi, gelas beker, corong penyaring, pengaduk, labu kaca, Erlenmeyer, kertas saring Wattman no 40, vacuum oven, gelas beker, botol kaca, botol plastik

3. Prosedur pelaksanaan proses ekstraksi maserasi teh hijau dan proses pengenceran teh hijau sesuai dengan SOP Laboatorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang

1. Proses Maserasi Ekstraksi.

- a) Teh hijau kering dihaluskan dengan blender kemudian ditimbang sebanyak 100 gram, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beker ukuran  $\pm$  1L
- b) Pelarut etanol dituangkan dengan perbandingan 1:9 (100 gr bahan yang telah dihaluskan dan 900 ml etanol 96% ), kemudian larutan dikocok sampai benar-benar tercampur ( $\pm$  30 menit)
- c) Bahan yang telah tercampur direndam dan diamkan pada suhu kamar selama satu malam sampai mengendap.
- d) Bahan yang telah tercampur disaring untuk memperoleh campuran pelarut dan zat aktif dengan menggunakan kertas saring *whatman* no 40

## 2. Proses evaporasi

- a) Campuran pelarut dan zat aktif yang telah disaring dimasukkan kedalam labu evaporasi 1L, kemudian dipasang pada evaporator.
- b) Water bath diisi air sampai penuh dan diatur suhunya sampai 90°C.
- c) Semua rangkaian alat dipasang dan disambungkan dengan aliran listrik.
- d) Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi.
- e) Tunggu sampai larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung ( $\pm 1,5 - 2$  jam)  $\pm 900$  ml
- f) Hasil ekstraksi diperoleh  $\pm 1/5$  dari bahan alami kering, sehingga dari 100 gr teh hijau dihasilkan ekstrak  $\pm 20$  gr, lalu dimasukkan kedalam botol kaca dan disimpan di dalam freezer.

## 3. Proses pengenceran.

Proses pengenceran ekstrak teh hijau dilakukan untuk pemberian 10 hari. Pada setiap kelompok perlakuan diberikan sebanyak 1 ml. Pengenceran (Aquadest) yang dibutuhkan adalah 70 ml/konsentrat.

Pemberian dilakukan secara oral dengan menggunakan spuit 1 cc yang ujungnya dipasang platina. Dosis yang akan digunakan yaitu 0,7mg/tikus, 1,4 mg/tikus dan 2,8 mg/ tikus (Mahmood *et al.*, 2015). Pemberian ekstrak teh hijau dilakukan setelah 2 jam pemberian monosodium glutamat, diberikan melalui spuit 1 cc yang ujungnya dipasang platina dengan metode sonde sesuai dengan dosis yang ditentukan. Spuit tersebut diisi dengan ekstrak teh hijau kemudian dimasukkan kedalam mulut melalui langit-langit secara perlahan sampai

ke faring lalu ke esophagus, kemudian setelah selesai spuit yang ujungnya diberi platina tersebut dikeluarkan.

a) Proses pengenceran ekstrak teh hijau dengan konsentrat yang digunakan.

Konsentrat 1 :  $0,7 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor tikus} \times 10 \text{ hari} = 35 \text{ mg}/70\text{ml}$

Konsentrat 2 :  $1,4 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor tikus} \times 10 \text{ hari} = 70 \text{ mg}/70\text{ml}$

Konsentrat 2 :  $2,8 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor tikus} \times 10 \text{ hari} = 140 \text{ mg}/70\text{ml}$

b) Hasil pengenceran dimasukkan ke dalam botol dan disimpan dalam lemari es.

#### **4.6.2. Pemberian Pajanan Monosodium Glutamat**

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

Monosodium glutamat (MSG) murni dari Sigma Aldrich

##### **2. Alat**

Spuit 3 ml yang ujungnya dipasang sonde aluminium yang dapat dimasukkan ke dalam mulut sampai ke lambung tikus, neraca *ohaus*

##### **3. Prosedur pelaksanaan pemberian MSG pada Tikus**

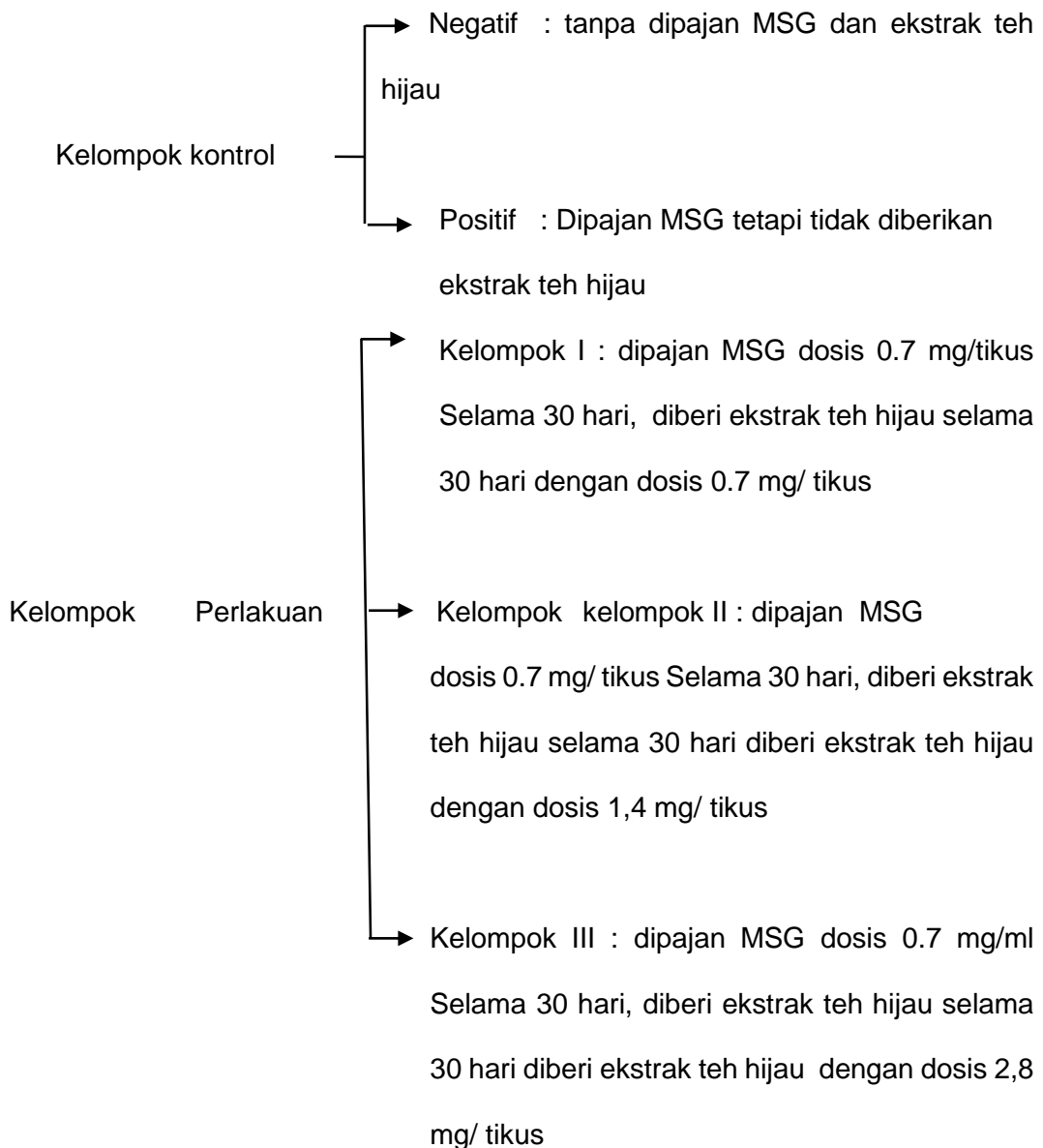
Berat badan tikus ditimbang dengan menggunakan neraca *ohaus* sebelum dipajan dengan monosodium glutamat, monosodium glutamat yang diberikan  $0.7\text{mg}/\text{tikus}$ , 1 kali pemberian selama 30 hari. Pemberian monosodium glutamat diberikan pada kelompok kontrol (positif) dan kelompok perlakuan I, II dan III. Monosodium glutamat dilarutkan dalam 1 ml aquades, diberikan secara oral dengan menggunakan sonde.

#### **4.6.3. Persiapan Hewan Uji Coba**

Terlebih dahulu tikus sebagai hewan coba di bagi dalam kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Tikus putih dibagi menjadi 2 kelompok yaitu 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan.

Kelompok tikus putih dibagi menjadi :



#### 4.6.4 Perawatan Tikus Putih

1. Bahan  
Palet/makanan tikus, aquades.
2. Alat
  - a. Spuit 3 ml yang ujungnya dipasang sonde aluminium yang dapat dimasukkan ke dalam mulut sampai ke lambung tikus.

b. Perlengkapan untuk pemeliharaan hewan coba

Ember plastik ukuran 37 cm x 50 cm x 12.5 cm yang dialasi sekam, sebagai tempat tikus. Ember Kawat berjaring untuk penutup ember plastik. Ember. Botol tempat minum.

3. Aklimatisasi Tikus

Aklimatisasi dilakukan selama 7 hari dengan tujuan mengkondisikan hewan dengan suasana laboratorium dan untuk menghilangkan stress akibat transportasi. Tikus dibiarkan dalam kandang tanpa diberikan perlakuan tetapi tetap diberikan makan dan minum secara *ad libitum*.

1. Pemeliharaan tikus

- a. Tikus ditempatkan pada kandang yang tampak dari luar (ember plastik ukuran 37 cm x 50 cm x 12.5 cm, yang dialasi sekam setebal 0.5-1cm.
2. Pergantian dan pencucian kandang modifikasi dilakukan setiap pagi dengan alas sekam diganti setiap 2 hari sekali untuk setiap kandang.
3. Sebelum tikus digunakan untuk penelitian, terlebih dahulu harus dilakukan antara lain penyediaan pakan berbentuk pellet. Komposisi pakan pellet yang dipakai adalah tersusun atas bahan jagung, bungkil, dedak, kapur, tepung tulang, minyak, metionin, lisin, garam, vitamin dan mineral. Semua bahan-bahan kemudian dicampur merata dan dicetak menjadi pakan berbentuk pellet. Setelah proses pembuatan pellet selesai, pellet harus dijemur dahulu agar bentuk pellet tidak hancur. Banyaknya pakan per hari yang disediakan adalah 40 gr/hari yang diberikan pada pagi hari serta minum yang diberikan menggunakan botol kecil sebanyak 150 ml per ekor/hari, konsumsi tikus adalah *ad libitum*. Sisa pakan dari pemberian hari sebelumnya tidak digunakan kembali.



4. Ciptakan suasana lingkungan yang stabil ventilasi yang cukup dan suhu ruangan yang baik dengan kebutuhan fisiologis tikus antara 27° C – 28° C.

**Tabel 4.3. Kandungan Pakan Standar Tikus Putih**

No	Kandungan	Jumlah
1	Air	Maksimal 12%
2	Protein Kasar	12-14%
3	Lemak Kasar	Minimal 4 %
4	Serat Kasar	Maksimal 6 %
5	Abu	Maksimal 7.5 %
6	Kalsium	0.9-12%
7	Fosfor	0.6-0.8 %

Keterangan: Kandungan pangan yang diberikan kepada tikus putih (Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang)

#### 4.6.5 Swab Vagina

1. Bahan untuk swab vagina

Methylin Blue/Giemsa, alkohol, NaCL 0,9%

2. Alat untuk pewarnaan preparat hapusan vagina

*Cotton bud (lidi kapas), cover glass, objec glass, dan mikroskop*

3. Prosedur pengambilan sampel sitologi dan pewarnaan preparat hapusan vagina

Pemeriksaan hapusan vagina dilakukan sebelum tikus di terminasi (*euthanasia*) untuk mengetahui fase siklus estrus tikus putih betina (*Rattus norvegicus*). Pengambilan sampel sitologi mulai diambil setelah perlakuan 30 hari. Sampel yang diperoleh dengan mengambil jaringan epitel vagina tikus. Alat dan bahan yang harus dipersiapkan yaitu. *Cotton bud* yang telah dibasahi larutan NaCL 0,9% di ambil kemudian dimasukkan ke dalam vagina tikus betina dengan sudut 45° dan melakukan pengusapan sebanyak 1 – 2 kali putaran. Hasil ulasan dari *cotton bud* dioleskan pada gelas objek dan dikeringkan, selanjutnya dilakukan pewarnaan pada preparat ulasan. Setiap pengambilan sampel ulas vagina dibuat sebanyak 2 preparat ulasan untuk 1 ekor tikus (Prayogha, 2012).

Preparat ulasan yang telah dikeringkan dimasukkan ke dalam larutan alkohol absolut untuk difikasi selama 3 menit kemudian diangkat, dicuci dengan air mengalir dan keringkan, selanjutnya, preparat tersebut dimasukkan ke dalam larutan Giemsa selama 15 menit, kemudian diangkat dan dibilas dengan air yang mengalir, lalu dikering anginkan, lalu diamati morfologi sel epitel superfisial di bawah mikroskop dengan pembesaran 100X dan 400x kemudian dicatat. Tanda sitologi fase estrus adalah sel berbentuk polygonal.

#### **4.6.6. Pengambilan Organ Tikus Putih**

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

Ketamin, *netral buffer formalin* 10 %, untuk pengawetan organ ovarium

##### **2. Alat**

Stoples kaca tertutup, Sduit Disposable 1 ml, Alat bedah (scapel, pinset, gunting), Tabung sebagai tempat penyimpanan organ sementara sebelum dibuat preparat histopatologi.

##### **3. Prosedur pembedahan tikus**

Pembedahan dilakukan setelah 30 hari perlakuan dengan langkah – langkah sebagai berikut :

- a. Peralatan bedah minor, pinset, gunting, kloroform, formalin 10% dan botol – botol tertutup untuk tempat organ tikus disiapkan.
- b. Tikus diterminasi injeksi ketamin 0.2 ml (10mg/ml) secara IM dan ditunggu beberapa menit sampai tikus mati (tidak bergerak lagi).
- c. Tikus diletakkan diatas alas papan, perut menghadap ke atas dengan paku payung yang ditancapkan pada ke empat telapak kaki. Dinding perut dibuka dengan gunting secara hati - hati, dengan sayatan pada garis tengah dilanjutkan ke samping kiri dan kanan.

- d. Organ ovarium siap dikirim untuk pemrosesan menjadi preparat di laboratorium Biokimia dan Patologi Anatomi untuk pemeriksaan kadar SOD dan Apoptosis
- e. Bangkai tikus dikubur oleh petugas laboratorium untuk mencegah pencemaran lingkungan.

#### **4.6.7. Prosedur Pembuatan Slide Histopatologi**

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

Jaringan ovarium, larutan *buffer formalin 10%*, alkohol, parafin

##### **2. Alat**

Kaset, Mesin *Tissue Tex Prosesor*, *Microtome*, objek glass

##### **3. Prosedur pelaksanaan**

- a. Jaringan atau spesimen penelitian harus sudah terfiksasi dengan formalin 10 % atau dengan bafer formalin 10 % minimal selama 7 jam sebelum dilakukan proses pengerjaan berikutnya
- b. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan lokasi yang akan di teliti
- c. Jaringan ovarium di potong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter
- d. Jaringan ovarium di masukan kekaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
- e. Jaringan kemudian diproses dengan alat Automatik *Tissue Tex Prosesor* atau dengan cara manual
- f. Standar di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB menggunakan Automatik *Tissue Tex Prosesor* selama 90 Menit
- g. Mengangkat Jaringan ovarium dari mesin *Tissue Tex Prosesor* lalu ovarium diblok dengan parafin sesuai dengan kode jaringan
- h. Memotong jaringan ovarium dengan alat *microtome* dengan ketebalan 3-5 mikron.

#### 4.6.8. Prosedur Deparafinisasi

1. Bahan

Jaringan ovarium, *xylol*, Alkohol

2. Alat

Oven, *chamber staining*, *hot plate*

3. Prosedur pelaksanaan

Setelah disayat atau dipotong dengan ketebalan 3-5 mikron, diletakkan dalam oven selama 30 menit dengan suhu 70-80°C, kemudian dimasukkan ke dalam 2 *chamber staining* larutan *xylol* masing-masing 20 menit, setelah itu dimasukkan ke-4 *chamber staining* alkohol masing-masing tempat 3 menit (Hidrasi), dan yang terakhir dimasukkan air mengalir selama 15 menit.

#### 4.6.9 Pemeriksaan Superoksida Dismutase

1. Bahan untuk pemeriksaan kadar Superoksida Dismutase

*Superoxide Dismutase Assay Kit* nomor katalog 706022 merk Cayman Chemical, 1 mM EGTA, 210 mM Manitol, 70 nM sucrose/gr jaringan, larutan PBS, Jaringan ovarium tikus

2. Alat untuk Pengukuran Kadar Superoxide Dismutase (SOD):

*Microplate reader* dengan filter panjang gelombang 450 nm, *High-precision transferpettor*, *EP tubes* dan *tip pipet disposable*, *Sentrifuse*, Mortal, *Deionized* atau *distilled water*, Kertas absorbansi, *Loading slot* untuk *wash buffer*

3. Prosedur Pemeriksaan Kadar SOD (*Cayman Chemical*) dengan Metode ELISA

Metode Elisa (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) adalah suatu teknik biokimia yang terutama digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Metode Elisa melibatkan setidaknya satu antibodi dengan spesifitas untuk antigen tertentu.

- a. Homogenasi jaringan
  - 1) Jaringan ovarium dibilas dengan *fosfat buffered salin* (PBS) dengan Ph 7,4 untuk menghilangkan sel darah merah, endapan atau gumpalan.
  - 2) Homogenisasi jaringan pada buffer HEPES (dingin) konsentrasi 20 mM, pH 7,2 yang mengandung 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, dan 70 mM sukrosa.
  - 3) Di sentrifuge selama lima menit dengan 1.500 xg pada suhu 4 °C.
  - 4) Supernatan diambil untuk pengujian. Jika dilakukan pada hari yang tidak sama, supernatan disimpan pada suhu -80 °C, sampel akan tetap stabil dalam satu bulan.
- b. Prosedur Assay
  - 1) Standart well SOD dibuat dengan menambahkan 200 µl cairan Radikal Detector dan 10 µl pada standard (tabung AG) pada tiap well.
  - 2) Sampel wells dibuat dengan menambahkan 200 µl cairan Radikal Detector dan 10 µl sampel pada tiap well.
  - 3) Reaksi dimulai dengan menambahkan 20 µl cairan *Xanthine Oxidase* pada semua well yang akan digunakan. Mencatat waktu saat memulai dan menambahkan *Xanthine Oxidase* secepat mungkin.
  - 4) Kocok 96 *well plate* dengan hati-hati, lakukan selama beberapa detik agar tercampur kemudian di tutup dengan penutup *plate*.
  - 5) Inkubasi *plate* pada *shaker* selama 20 menit pada suhu ruang. Baca absorbansi pada 440-460 nm menggunakan *plate reader*.

#### **4.6.10. Pemeriksaan Apoptosis**

1. Bahan untuk pemeriksaan apoptosis

*Mayer, Xylene, Ethanol 100%, ethanol 95% dan ethanol 70%, Aquadest, In Situ Cell Death Detection Kit* (terdiri dari nuclease, *working solution* (10-20µg/ml in

10 mM Tris/HCL, pH 7.4-8), Phosphate Buffer Saline, Proteinase K, Larutan Propidium Iodide, Jaringan ovarium tikus, Aquadest

2. Alat Untuk Pemeriksaan Apoptosis Ovarium (TUNEL)

In situ cell death kit, POD Merk Roche. No Catalog. 11684817910, Siliconize cover slip, Moist chamber, Cover slide ukuran 18 mm, Sarung tangan, Tabung *micro centrifuge* (1.5- mL )

3. Prosedur pemeriksaan Apoptosis

Metode untuk mendeteksi sel yang mengalami apoptosis dengan cara mendeteksi fragmentasi DNA. Metode yang sering digunakan untuk mendeteksi fragmentasi DNA Secara enzimatis adalah dengan cara TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*) Merk Roche

Prosedur atau cara kerja :

1. Prosedur *paraffin-embedded tissue*

Perlakuan sebelum dilakukan *paraffin-embedded tissue* dengan Proteinase K, *nuclease free treatment* dan 3-prosedur alternatif yang telah dijelaskan.

- a. Proses *dewax* dan rehidrasi slide berdasarkan dengan standar protokol (dengan pemanasan pada 60 °C diikuti dengan pencucian menggunakan xylene dan rehidrasi melalui serangkaian tahapan etanol dan *double distil water*).
- b. Inkubasi bagian slide selama 15-30 menit pada suhu 21-37 ° C dengan *Proteinase K working solution*
- c. Bilas *slide* dua kali dengan PBS.

2. Prosedur Pelabelan

a. Persiapan untuk reaksi TUNEL campuran

Sepasang tabung terdiri dari vial 1: Enzim Solution, dan vial 2: Label Solution untuk pewarnaan 10 sampel dengan menggunakan 50 µl

*TUNEL reaction mixture* tiap sampel dan 2 kontrol negatif dengan menggunakan 50  $\mu$ l *Label Solution* per control.

Tindakan :

- 1) Hilangkan 100  $\mu$ l *Label Solution* (vial 2) untuk dua kontrol negatif
- 2) Tambahkan total volume (50  $\mu$ l) larutan enzim (vial 1) pada 450  $\mu$ l *Label Solution* di vial 2 untuk mendapatkan 500 ml campuran reaksi TUNEL.
- 3) Aduk rata untuk menyeimbangkan komponen.

b. Tambahkan reagen yang dibutuhkan

Micrococcal nuklease atau DNase I kelas I

c. Kontrol

Dua kontrol negatif dan kontrol positif harus dimasukkan dalam setiap eksperimental.

- 1) Kontrol Negatif: Inkubasi dan permeabilize sel dalam 50  $\mu$ l / well *Label Solution* (tanpa transferase terminal) dalam reaksi TUNEL.
- 2) Kontrol positif: Inkubasi dan permeabilized sel dengan mikro nucleas coccal atau DNase I, kelas I (3000 U/ml-3 U/ml dalam 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mg / ml BSA) selama 10 menit pada 15-25 °C untuk menginduksi kerusakan pada untaian DNA, sebelum prosedur pelabelan.

3. Konversi Sinyal

a. Tambahkan peralatan dan cairan yang dibutuhkan adalah *Washing buffer* (PBS), *Humidified chamber*, *Parafilm/ coverslipes*, *DAB Substrate*, *Mounting medium*

b. Prosedur

- 1) Keringkan area di sekitar sampel, kemudian tambahkan 50 ml Converter-POD (vial 3) pada sampel.
- 2) Inkubasi slide dalam *Humidified chamber* pada suhu 37°C selama 30 menit.
- 3) Cuci slide 3 kali dengan PBS.
- 4) Tambahkan 50-100 ml *DAB Substrat*
- 5) Inkubasi slide pada suhu 15-25 °C. selama 10 menit
- 6) Cuci slide 3 kali dengan PBS.
- 7) Letakkan dibawah kaca coverslip (misalnya dengan PBS / gliserol).

#### **4.6.11. Penghitungan Jumlah Sel Apoptosis**

##### 1. Bahan

Slide jaringan

##### 2. Alat

Mikroskop Merk Olympus DP 71 dengan pembesaran 1000 x sebanyak 20 lapang pandang.

##### 3. Prosedur Pemeriksaan sel

- a. Setiap slide diamati dengan menggunakan mikroskop Merk Olympus DP 71 dengan pembesaran 1000 x
- b. Tiap slide diamati dalam 20 lapang pandang dengan pembesaran 1000x kemudian ditentukan rata-rata prosentasi jumlah sel granulosa yang apoptosis dalam pengamatan 1 slide.
- c. Setiap lapang pandang dihitung jumlah seluruh sel granulosa folikel ovarium, kemudian menghitung jumlah sel granulosa yang mengalami apoptosis. Setelah itu membagi jumlah sel granulosa yang mengalami apoptosis dengan jumlah seluruh sel granulosa folikel per lapang pandang



kemudian dikalikan 100%. Jumlah apoptosis di 20 lapang pandang dihitung lalu dibagi 20.

- d. Ditentukan rata-rata prosentase jumlah sel granulosa yang apoptosis untuk 1 kelompok perlakuan/dari pengamatan 5 slide.
- e. Sel yang mengalami apoptosis berwarna coklat pada inti sel sedangkan yang tidak mengalami apoptosis berwarna biru.
- f. Dokumentasi setiap pengamatan (Pemotretan)

#### **4.7. Analisis Data**

Dalam penelitian ini teknik analisis data dilakukan dalam beberapa tahapan penghitungan, berturut-turut yaitu uji normalitas data sampel dengan uji *Shapiro-Wilk*, uji homogenitas dengan uji *Leuvene's* dan uji hipotesa dengan *Anova One Way*. Semua penghitungan dilakukan dengan bantuan piranti lunak (*soft-ware*) *SPSS for Windows 23.0*.

##### **4.7.1. Uji Prasyarat Parametrik**

Sebelum dilakukan uji hipotesa dengan analisis parametrik, maka data yang telah diperoleh akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik, Uji Prasyarat parametrik adalah uji ststistik untuk mengetahui sebaran data normal dan homogen. Uji normalitas data dalam penelitian ini digunakan uji *Shapiro-Wilk*. Pada uji ini kriteria keputusan dengan melihat nilai probabilitas kesalahan empirik pada *p-value*. Jika nilai  $p > 0.05$ , maka disimpulkan data terdistribusi normal. Jika data berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji homogenitas data, dalam penelitian ini menggunakan uji *Levene's*. Pada uji ini kriteria keputusan dengan melihat nilai probabilitas kesalahan empirik pada *p-value*. Jika nilai  $p > 0.05$ , maka disimpulkan data homogen. Jika syarat-syarat diatas terpenuhi, selanjutnya dilakukan uji hipotesa dengan uji parametrik. (Uyanto, 2006).

#### 4.7.2. Uji Hipotesis

Pengujian dengan *Anova One Way* digunakan untuk membandingkan rerata variabel terukur antara kelompok sampel kontrol dengan kelompok perlakuan. Analisis ini dilakukan yaitu terhadap data kadar SOD pada ovarium dan apoptosis sel folikel pada ovarium. Tujuan teknik analisis ini digunakan adalah untuk mengetahui apakah ekstrak teh hijau dapat meningkatkan kadar SOD pada ovarium dan mencegah terjadinya apoptosis sel granulosa folikel ovarium pada tikus yang telah dipajan oleh MSG. Jika pada uji *Anova One Way* ini menghasilkan kesimpulan  $H_0$  ditolak dan  $H_a$  diterima atau kesimpulan ada perbedaan yang bermakna (signifikan), maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda, yaitu dipilih uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*) (Hanafiah, 2012). Tujuan digunakan uji *LSD* adalah untuk menemukan dosis ekstrak maserasi teh hijau yang paling berpengaruh pada peningkatan kadar SOD di ovarium dan apoptosis sel granulosa folikel di ovarium pada tikus (*Rattus Norvegicus*).

#### 4.7.3. Uji Korelasi

Uji korelasi dilakukan untuk menguji ada tidaknya tingkat keeratan hubungan antara dua variabel terukur yaitu korelasi antara kadar SOD ovarium dan apoptosis sel granulosa folikel ovarium. Dalam penelitian ini jika data terdistribusi normal maka digunakan uji korelasi *Pearson*. Uji regresi linear sederhana, namun jika data tidak terdistribusi normal digunakan uji *Spearman's rho*. Kriteria keputusan berdasarkan nilai Sig atau *p-value*. Jika *p-value* >  $\alpha$  0.05 maka dapat disimpulkan tidak ada korelasi yang bermakna antara dua variable, jika *p-value* <  $\alpha$  0.05 maka dapat disimpulkan terdapat korelasi bermakna antara

dua variabel. Tingkat keeratan hubungan (koefisien korelasi/KK) dapat dibagi menjadi tujuh angkatan (Hasan), yaitu :

$0 < KK \leq 0,20$ , korelasi sangat rendah/lemah tapi pasti

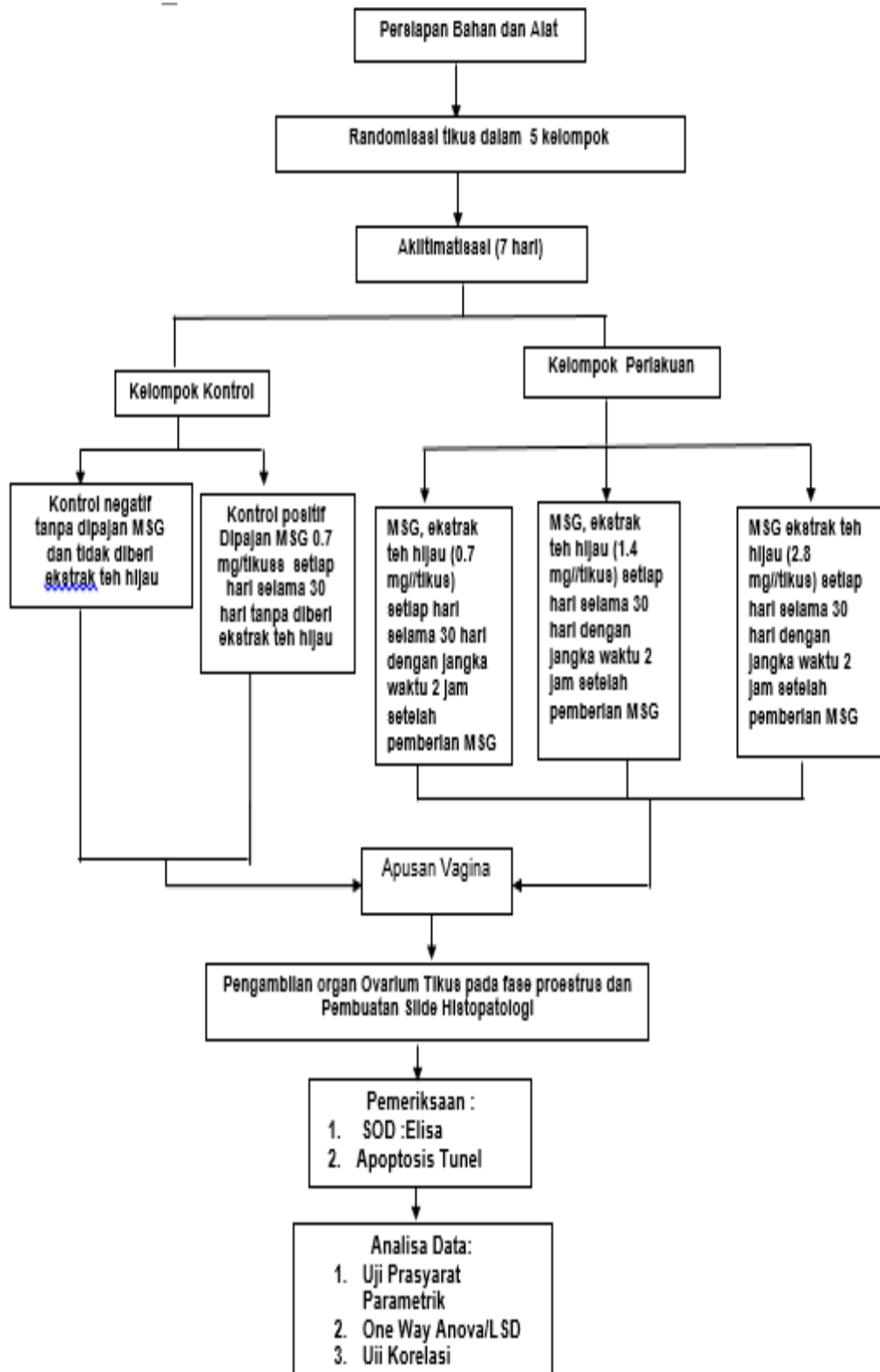
$0,20 < KK \leq 0,40$ , korelasi rendah/lemah tapi pasti

$0,40 < KK \leq 0,70$ , korelasi yang cukup berarti

$0,70 < KK \leq 0,90$ , korelasi yang tinggi, kuat

$0,90 < KK \leq 1,00$ , korelasi sangat tinggi, kuat sekali, dapat diandalkan

#### 4.7. Alur penelitian



Gambar 4.1. Skema Alur Penelitian

