

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan dikelompokkan menjadi 7 kelompok dengan 5 kali ulangan.

Perlakuan yang digunakan terdiri dari :

1. Kelompok P1 : Kelompok kontrol negatif sebanyak 5 ekor mencit tanpa diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dan tanpa dipapar timbal (Pb) Asetat.
2. Kelompok P2 : Kelompok kontrol positif sebanyak 5 ekor mencit diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dengan dosis 0 mg/gr BB per hari yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB.
3. Kelompok P3 : Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dengan dosis 0,1 mg/gr BB per hari yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB.
4. Kelompok P4 : Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dengan dosis 0,2 mg/gr BB per hari yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB.
5. Kelompok P5 : Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dengan dosis 0,3 mg/gr BB per hari yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB.

6. Kelompok P6 : Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dengan dosis 0,4 mg/gr BB per hari yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB
7. Kelompok P7 : Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dengan dosis 0,5 mg/gr BB per hari yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel bebas : Ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L), dengan dosis 0,1 mg/kg BB, 0,2 mg/kg BB, 0,3 mg/kg BB, 0,4 mg/kg/BB, 0,5 mg/kg BB per hari. Kemudian Timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB
2. Variabel tergantung : malondialdehid (MDA), kualitas spermatozoa yang meliputi konsentrasi, motilitas, viabilitas, dan abnormalitas sperma.
3. Variabel kendali : Mencit (*Mus musculus* L) strain Balb/c, jenis kelamin jantan, dengan berat badan 20-30 gr, usia 2-3 bulan sebanyak 35 ekor, daun kelor (*Moringa oleifera* L), Pakan dan minum mencit.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan desember 2013 di Laboratorium Fisiologi hewan dan biosistem jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Tabel 1 : Rancangan waktu penelitian

Kegiatan	Desember				Januari			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Aklimatisasi		v						
Estraksi		v						
Perlakuan			V	v	v			
Pengambilan data						v		

3.4 Populasi dan Sampel

Hewan uji yang dipakai adalah mencit Balb/c (*Mus musculus* L) dengan 7 kelompok perlakuan masing-masing 5 ekor. Jenis kelamin jantan, umur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 20-30 gram sebanyak 35 ekor.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba (bak plastik), tempat makan dan minum mencit, alat pencekok oral (sonde modifikasi), timbangan analitik, hot plate, labu ukur, gelas ukur, beaker glass, tabung efendorf,

tabung erlenmeyer, hemositometer, obyek glass, hand counter, pipet tetes, seperangkat alat bedah, rotari evaporator, mikroskop computer, kaca preparat, kapas, dan spidol permanen.

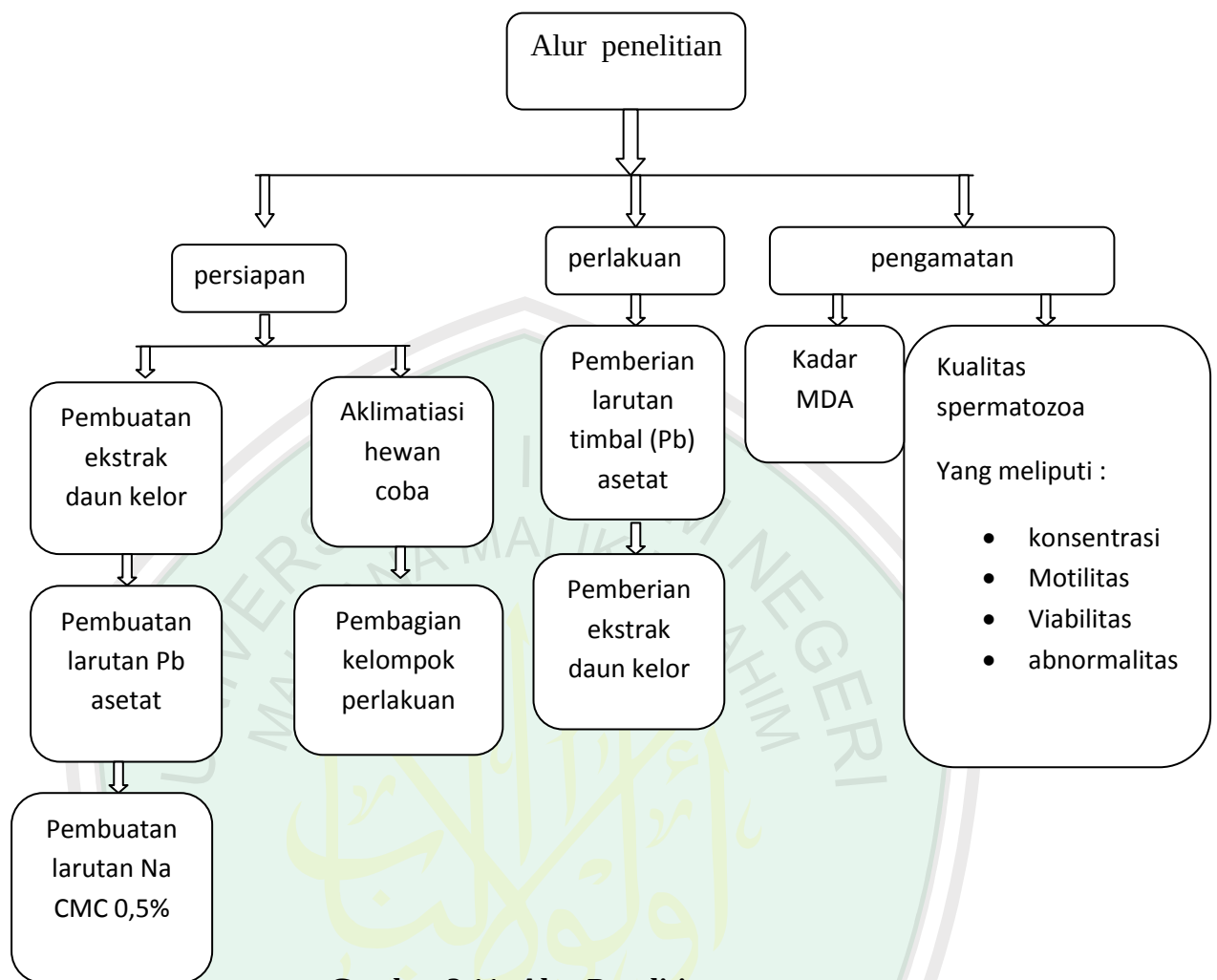
3.5.2 Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah mencit, serbuk daun kelor (*Moringa oleifera* L.), aquades, pakan mencit berupa pelet, Na CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*), NaCl fisiologis, pewarna eosin, negrosin, kloroform dan alkohol 70%.

3.6 Prosedur Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi 3 tahap, yaitu :

1. Tahap persiapan : tahap yang meliputi persiapan hewan coba (aklimatisasi), pembuatan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L.), pembuatan larutan Na CMC 0,5%, pembuatan larutan timbal (Pb) serta penentuan dosis perlakuan.
2. Tahap pelaksanaan : tahap yang meliputi pengelompokkan dan perlakuan hewan coba
3. Tahap pengambilan data : tahap yang meliputi perhitungan kadar malondialdehid (MDA), kualitas spermatozoa yang meliputi konsentrasi, motilitas, viabilitas, dan abnormalitas sperma.



Gambar 2.11: Alur Penelitian

3.6.1 Persiapan Perlakuan

3.6.1.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dilakukan, hal-hal yang perlu dipersiapkan adalah tempat pemeliharaan hewan coba yang meliputi kandang, serutan kayu, tempat pakan dan minum mencit. Selanjutnya, hewan coba diaklimatisasi sebelum perlakuan dilakukan selama satu minggu. Mencit diberi pakan dan minum secara ad libitum (berlebih).

3.6.1.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.)

Sampel yang digunakan adalah serbuk daun kelor (*Moringa oleifera* L.) sebanyak 100 gram. Selanjutnya dimaserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3 kali sambil diaduk sesekali selama 24 jam.

Serbuk yang telah dimaserasi disaring dengan corong buncher. Filtrat yang telah diperoleh dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya disimpan dan digunakan sebagai perlakuan.

3.6.1.3 Pembuatan Sediaan Larutan Na CMC 0,5 %

Sediaan larutan Na CMC 0,5% dibuat dengan menaburkan 50 mg Na CMC ke dalam 10 ml aquades, kemudian diaduk hingga homogen kemudian dipanaskan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai gel. Selanjutnya diencerkan dalam labu ukur dengan aquades hingga volume 100 ml.

3.6.1.4 Perhitungan Dosis Timbal Asetat 0,3 mg/gr Berat Badan Mencit

A. Jumlah Timbal Asetat Yang Dibutuhkan

$0,3 \text{ mg/gr} = 0,0003 \text{ gr/gr}$ (satunya adalah berat badan mencit). Rata-rata berat badan mencit yang digunakan adalah 20 gram, maka timbal yang dibutuhkan tiap mencit adalah $0,0003 \times 20 = 0,006 \text{ gram/ mencit}$. Jadi jumlah timbal asetat yang dibutuhkan untuk 35 mencit adalah $0,006 \times 35 = 0,21 \text{ gram}$. Akan tetapi dikarenakan dalam praktiknya harus dlebihkan maka timbal asetat total stok ditambah hingga menjadi sebanyak 0,25 gram.

B. Dosis Stok

Volume sonde (ml) x jumlah mencit (ekor) x lama pemberian (hari)

0,5 (volume sonde) x 35 ekor mencit x 7 hari = 122,5 ml

Total stok adalah sebanyak 122,5 ml, akan tetapi dikarenakan dalam praktiknya harus dlebihhkan maka volume total stok larutan menjadi sebanyak 123 ml. Larutan stok ini digunakan selama 7 hari perlakuan pemberian timbal asetat.

3.6.1.5 Pembuatan Sediaan Larutan Timbal Asetat 0,3 mg/gr Berat Badan

Sediaan larutan timbal asetat 0,3 mg/gr berat badan dibuat dengan mengukur stok timbal asetat sebanyak 0,21 gram pada neraca analitik. Kemudian dilarutkan dengan aquades hingga homogen, setelah itu ditambah aquades hingga mencapai volume 120 ml. Hal ini didasarkan pada pemberian timbal asetat pada mencit adalah sebesar 0,5 ml karena batas maksimum lambung mencit adalah 1 ml sehingga total volume yang dibutuhkan selama 7 hari untuk 5 ekor mencit adalah sebesar 123 ml. Dikarenakan volume larutan yang diperlukan dalam praktik selalu melebihi total larutan stok, maka volume larutan ditambah hingga volume 120 ml.

3.6.1.6 Perhitungan Dosis Estrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.)

Berdasarkan jurnal penelitian Fauzi (2008) menyatakan bahwa dosis 0,2mg/g BB mampu menurunkan kadar MDA pada epididimis dan meningkatkan jumlah spermatozoa pada mencit. Pada penelitian ini digunakan ekstrak tanaman, yang berasal dari daun kelor (*Moringa oleifera* L.)

Penelitian ini menggunakan 5 dosis yang berbeda. Rentang kelima dosis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

A. Dosis Perlakuan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* L)

- a. Dosis I : 0,1 mg/ gr BB per hari = 0,0001 gr/gr BB
- b. Dosis II : 0,2 mg/ gr BB per hari = 0,0002 gr/gr BB
- c. Dosis III : 0,3 mg/ gr BB per hari = 0,0003 gr/gr BB
- d. Dosis IV : 0,4 mg/ gr BB per hari = 0,0004 gr/gr BB
- e. Dosis V : 0,5 mg/ gr BB per hari = 0,0005 gr/gr BB

B. Dosis Perlakuan

Dosis stok = volume sonde (ml) x jumlah mencit (ekor) x lama pemberian (hari)
= 15 ml/ hari

Dosis stok = 0,5 x 5 x 7 = 17,5 ml

3.6.1.7 Perhitungan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* L) Tiap

Dosis Perlakuan

- a. Dosis I : 0,0001 gr / 0,5 ml = y gr / 17,5 ml ; maka y = 0,0035 gr
- b. Dosis II : 0,0002 gr / 0,5 ml = y gr / 17,5 ml ; maka y = 0,007 gr
- c. Dosis III : 0,0003 gr / 0,5 ml = y gr / 17,5 ml ; maka y = 0,0105 gr
- d. Dosis IV : 0,0004 gr / 0,5 ml = y gr / 17,5 ml ; maka y = 0,014 gr
- e. Dosis V : 0,0005 gr / 0,5 ml = y gr / 17,5 ml ; maka y = 0,0175 gr

Total kebutuhan ekstrak = 0,0035gr + 0,007gr + 0,0105gr + 0,014 gr + 0,0175 gr
= 0,0525 gr

Jadi stok yang dibutuhkan selama 7 hari adalah 0,0525 gram.

3.6.1.8 Perhitungan Larutan Stok Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* L)

1. Dosis V = $0,0525\text{ gr} \times 0,5\text{ ml} = 0,0005\text{ gr} \times k\text{ ml}$

$$k = 52,5\text{ ml}$$

Jadi 0,0525 gram ekstrak dilarutkan dengan Na-CMC hingga volumenya 52,5 ml, kemudian diambil 17,5 ml untuk stok ekstrak dosis V untuk perlakuan selama 5 hari. Sisa stok sebanyak 35 ml akan diencerkan dan digunakan untuk dosis selanjutnya.

2. Dosis IV = $0,0005\text{ gr} \times 35\text{ ml} = 0,0004\text{ gr} \times k\text{ ml}$

$$k = 43,75\text{ ml}$$

Jadi sisa larutan dosis V sebanyak 35 ml diencerkan dengan Na-CMC hingga volume 43,75 ml. Diambil 17,5 ml untuk stok ekstrak dosis IV selama 7 hari sehingga sisa larutan adalah sebesar 26,25 ml.

3. Dosis III = $0,0004\text{ gr} \times 26,25\text{ ml} = 0,0003\text{ gr} \times k\text{ ml}$

$$k = 35\text{ ml}$$

Jadi sisa larutan ekstrak dosis IV sebanyak 26,25 ml diencerkan dengan Na-CMC hingga volumenya 35 ml. Diambil 17,5 ml untuk stok larutan ekstrak dosis III selama 7 hari sehingga sisa larutan adalah 17,5 ml.

4. Dosis II = $0,0003\text{ gr} \times 17,5\text{ ml} = 0,0002\text{ gr} \times k\text{ ml}$

$$k = 26,25\text{ ml}$$

Jadi sisa larutan ekstrak dosis III sebesar 17,5 ml diencerkan dengan Na-CMC hingga volume 26,25 ml dan diambil 17,5 ml untuk stok larutan ekstrak dosis II selama 7 hari. Sisa larutan adalah sebesar 8,75 ml.

5. Dosis I = $0,0002\text{ gr} \times 8,75\text{ ml} = 0,0001\text{ gr} \times k\text{ ml}$

$$k = 17,5\text{ ml}$$

Jadi sisa larutan ekstrak dosis II sebesar 8,75 ml kemudian diencerkan dengan Na-CMC hingga volume 17,5 ml. Diambil 17,5 ml untuk stok larutan ekstrak dosis I selama 7 hari sehingga tidak tersisa larutan stok (0 ml).

3.6.2 Tahap Pelaksanaan

3.6.2.1 Perlakuan Pada Hewan Coba

1. Kelompok P1 : Kelompok kontrol negatif sebanyak 5 ekor mencit tanpa diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dan tanpa dipapar timbal (Pb) Asetat.
2. Kelompok P2 : Kelompok kontrol positif sebanyak 5 ekor mencit diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dengan dosis 0 mg/gr BB per hari yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB.
3. Kelompok P3 : Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dengan dosis 0,1 mg/gr BB per hari yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB.
4. Kelompok P4 : Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dengan dosis 0,2 mg/gr BB per hari yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB.
5. Kelompok P5 : Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dengan dosis 0,3 mg/gr BB per hari yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB.

6. Kelompok P6 : Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dengan dosis 0,4 mg/gr BB per hari yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB.
7. Kelompok P7 : Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L) dengan dosis 0,5 mg/gr BB per hari yang dipapar timbal (Pb) Asetat dengan dosis 0,3 mg/gr BB.

3.6.2.2 Perlakuan Pemaparan Timbal (Pb) Asetat

Pemaparan timbal (Pb) Asetat diberikan secara oral dengan menggunakan sonde lambung atau spuit yang dimodifikasi, yang diberikan sekitar pukul 08.00 WIB pagi dalam jangka waktu selama 7 hari pada masing-masing perlakuan.

3.6.2.3 Perlakuan Pemberian Ekstrak Etanol Kelor (*Moringa oleifera* L)

Pemaparan ekstrak etanol kelor (*Moringa oleifera* L) yang dilakukan dengan cara oral menggunakan sonde lambung atau spuit yang dimodifikasi, diberikan pada pukul 08.00 WIB pagi dalam jangka waktu 14 hari setelah hari ke-15 aklimatisasi (atau hari ke-8 setelah pemaparan timbal asetat) pada masing-masing mencit perlakuan kecuali pada kelompok kontrol dan P2 (kelompok yang hanya diberi ekstrak timbal asetat saja).

3.6.3 Tahap Pengambilan Data

3.6.3.1 Tahap Pengambilan Sperma

Pengambilan sperma dilakukan dengan membedah mencit dan diambil epididimis dengan melakukan pemotongan ujung kauda epididimis dan bagian

ampula duktus deferen. Sperma yang ada di dalam epididimis dipelurut, dan selanjutnya ditampung di dalam tabung efendorf.

3.6.3.2 Perhitungan Motilitas Sperma

Suspensi sperma pada larutan stok diteteskan pada kaca preparat cekung, kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400X, selanjutnya dilakukan penaksiran penilaian motilitas sperma. Penaksiran motilitas sperma adalah suatu prosedur visual dan dinyatakan secara komparatif tidak mutlak. Motilitas spermatozoa ditentukan secara keseluruhan atau sebagai rata-rata populasi sperma pada semen segar yang ditampung untuk dilakukan pemeriksaan gerak masa dan individu. Penaksiran gerakan sperma dinyatakan dalam persen (%), jumlah sperma ditaksir dan dinyatakan dalam persen (%) dibandingkan dengan yang tidak bergerak (Feradis, 2010).

Penaksiran motilitas sperma dapat diketahui dengan melihat pergerakan sperma dan dapat dikategorikan sebagai berikut ; (a) pergerakan imotil dinilai 0%, (b) gerakan sperma berayun atau melingkar dan tidak ada gelombang dinilai $\leq$ 50%, (c) pergerakan sperma yang progresif dan menghasilkan pergerakan massa dinilai 50-80%, (d) pergerakan sperma progresif yang gesit dan segera membentuk gelombang dinilai 90%, dan (e) gerakan yang progresif dan gelombang yang sangat cepat dinilai 100% (Toelihere, 1993).

3.6.3.3 Perhitungan Jumlah Viabilitas Sperma

Perhitungan jumlah viabilitas diperoleh dengan cara membuat preparat apusan dari larutan stok, kemudian diwarnai dengan eosin negrosin, selanjutnya

diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400X. Pengamatan difokuskan pada bagian kepala sperma, apabila pada kepala berwarna transparan hal ini menandakan bahwa sperma hidup. Sperma yang mati ditandai dengan morfologi kepala yang terwarnai. Kepala menjadi terwarnai karena zat eosin negrosin akan menembus masuk dan mewarnai spermatozoa yang rusak dan mati, hal ini disebabkan karena permeabilitas membran sel spermatozoa yang mati meningkat di daerah kepala yang tidak tertutup akrosom (Feradis, 2010).

Pengamatan viabilitas spermatozoa untuk membandingkan persentase spermatozoa yang hidup dan yang mati, dapat diamati pada luas bidang pandang yang sama dengan jumlah keseluruhan ± 200 ekor spermatozoa (Salisbury, 1998). Nilai viabilitas spermatozoa dinyatakan dalam persen. Persentase viabilitas sperma dapat diketahui dengan menggunakan persamaan atau rumus sebagai berikut (Feradis, 2010) :

$$\text{Viabilitas (\%)} = \frac{n}{n+m} \times 100\%$$

Keterangan :

n = Sperma hidup yang terhitung

m = sperma mati yang terhitung

3.6.3.4 Perhitungan Jumlah Abnormalitas Sperma

Perhitungan abnormalitas sperma terwakili dengan membuat preparat apusan dari larutan stok dengan cara menyiapkan objek glass dan ditetesi larutan stok yang berisi sperma, lalu dicampur dengan setetes zat warna eosin negrosin sampai homogen, kemudian mengambil objek glass yang berisi campuran sperma dan zat warna eosin negrosin dengan posisi miring, lalu dilakukan pendorongan

sepanjang glass sehingga terbentuk ulasan tipis selanjutnya dikeringkan dalam suhu kamar selama ± 15 menit. Preparat yang sudah dikeringkan selanjutnya dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400X. Pengamatan difokuskan pada bagian leher, kepala, dan ekor yang abnormal (Toelihere, 1993).

Nilai abnormalitas spermatozoa dinyatakan dalam persen. Persentase abnormalitas sperma dapat diketahui menggunakan persamaan atau rumus sebagai berikut (Feradis, 2010) :

$$\text{Abnormalitas (\%)} = \frac{n}{n+m} \times 100\%$$

Keterangan :

n = Sperma abnormal yang terhitung

m= sperma normal yang terhitung

3.6.3.5 Perhitungan Konsentrasi Sperma

Perhitungan konsentrasi sperma dilakukan dengan cara sebagai berikut (Fauzi, 2008) :

1. Larutan stok yang berisi sperma dilakukan dengan menggunakan pipet eritrosit sampai tanda 0,5 kemudian diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis sampai tanda 101
2. Campuran tersebut dikocok secara hati-hati selama 2-3 menit
3. Beberapa tetes dibuang dan dikocok
4. Beberapa tetes lagi dibuang, kemudian satu tetes ditempatkan pada bilik hitung yang sudah diberi kaca penutup
5. Dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop, dan dilakukan perhitungan pada 5 kamar dengan arah zig zag

6. Jumlah sperma per ml dapat diketahui dengan cara menggunakan rumus jumlah sperma terhitung x 10 juta/ml

Perhitungan rumus tersebut berdasarkan pada perhitungan sperma dari 5 kamar hitung yang masing-masing kamar terdiri dari 16 ruang kecil, maka di dalam kamar hitung terdiri dari 80 ruangan kecil. Seluruh gelas hemocytometer memiliki 400 ruangan kecil, dengan volume setiap ruangan kecil adalah $0,1 \text{ mm}^3$, dan pengenceran sperma tersebut sebanyak 200 kali, dan apabila 5 kamar atau 80 ruangan kecil terdapat X sperma, maka konsentrasi sperma yang diperiksa adalah (Feradis, 2010) :

$$\text{Konsentrasi Sperma} = X \times \frac{400}{80} \times 10 \times 200 = 10.000 = X \times 0,01 \text{ juta sperma/mm}^3 \text{ atau } X \times 10 \text{ juta sperma/ml atau}$$

$$\text{Konsentrasi sperma (juta/m)} = \sum \text{spermatozoa/ml}$$

3.6.3.6 Perhitungan Kadar MDA Epididimis Mencit

Menghitung kadar MDA dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV dengan panjang gelombang 534 nm. Sementara itu prosedur yang dilakukan untuk menentukan kadar MDA epididimis pada mencit sebagai berikut (Fauzi, 2008) :

1. TBA/ *buffer reagent* dilarutkan dengan 100 mL aquadest, selanjutnya ditambah 0,5 *sodium hidroxyde* dan 100 mL asam asetat glasial
2. Sebanyak 500 μl sampel (standart MDA untuk spektrofotometer) dimasukkan dalam tabung ependorf yang masing-masing telah diberi label
3. Ditambah 0,5 mL aquadest pada masing-masing tabung
4. Ditambahkan 0,5 mL TBA/ *buffer reagent*

5. Selanjutnya pada masing-masing tabung diinkubasi di dalam waterbath dengan suhu 95°C selama 60 menit
6. Setelah diinkubasi, masing-masing tabung dikeluarkan dari waterbath dan setelah dingin masing-masing tabung disentrifugasi dengan kecepatan 7000rpm selama 10 menit
7. Supernatan diambil untuk selanjutnya dianalisis dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 534 nm

3.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan dianalisis dengan menggunakan uji statistik ANOVA tunggal karena hanya menggunakan satu faktorial. Bila terdapat perbedaan sangat nyata dilanjutkan dengan uji lanjut menggunakan BNJ (Beda Nyata Jujur) dengan signifikan 1% untuk melihat perbedaan sangat nyata antara kelompok kontrol dengan masing-masing perlakuan.