

**PENGARUH EKSTRAK BUAH DELIMA MERAH (*Punica granatum L.*)
TERHADAP JUMLAH FOLIKEL OVARIUM MENCIT BETINA YANG
DIBERI PAPARAN FORMALDEHID**

SKRIPSI

Oleh:

ARIEN ALVI FATHONIYAH

17930075



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**PENGARUH EKSTRAK BUAH DELIMA MERAH (*Punica granatum L.*)
TERHADAP JUMLAH FOLIKEL OVARIUM MENCIT BETINA YANG
DIBERI PAPARAN FORMALDEHID**

SKRIPSI

**Diajukan Kepada:
Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Mmenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA IBRAHIM
MALANG
2021**

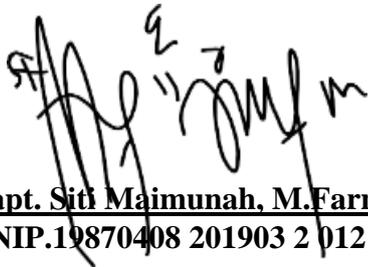
**PENGARUH EKSTRAK BUAH DELIMA MERAH (*Punica granatum L.*)
TERHADAP JUMLAH FOLIKEL OVARIUM MENCIT BETINA YANG
DIBERI PAPARAN FORMALDEHID**

SKRIPSI

Oleh :
ARIEN ALVI FATHONIYAH
NIM : 17930075

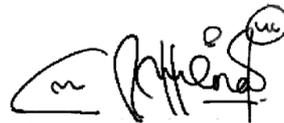
Telah diperiksa dan disetujui untuk Diuji :
Tanggal : 11 Juni 2011

Pembimbing I



apt. Siti Maimunah, M.Farm.
NIP.19870408 201903 2 012

Pembimbing II



Meilina Ratna D, S.Kep., NS., M.Kep.
NIP. 19820523 200912 2 001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Farmasi

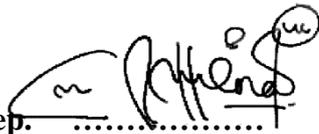


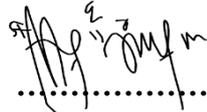
apt. Abdul Hakim, M.P.I, M.Farm.
NIP. 19761214 200912 1 002

SKRIPSI

Oleh :
ARIEN ALVI FATHONIYAH
NIM : 17930075

**Telah dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Dinyatakan
Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Sarjana
Farmasi (S.Farm)
Tanggal: 16 Juni 2021**

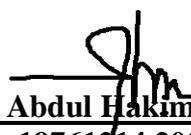
Ketua Penguji : Meilina Ratna D, S.Kep., NS., M.Kep. 
NIP. 19820523 200912 2 001

Anggota : apt. Siti Maimunah, M.Farm. 
NIP. 19870408 201903 2 012

Fidia Rizkiah Inayatilah, S.ST., M.Keb. 
NIP. 19851209 200912 2 004

apt. Hajar Sugihantoro, M.P.H. 
NIP. 19851216 20160801 1 086

**Mengetahui,
Ketua Program Studi Farmasi**


apt. Abdul Hakim, M.P.I, M.Farm
NIP. 19761214 200912 1 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Arien Alvi Fathoniyah

NIM : 17930075

Jurusan : Farmasi

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Judul Skripsi : Pengaruh Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica Granatum L.*) Terhadap Jumlah Folikel Ovarium Mencit Betina yang Diberi Paparan Formaldehid

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil ide proyek (Meilina Ratna Dianti, S.Kep., NS., M.Kep.) bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar Pustaka.

Malang, 11 Juni 2021

Yang membuat pernyataan,



Arien Alvi Fathoniyah
NIM. 17930075

MOTTO

فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا^٥

**“Maka, sesungguhnya beserta kesulitan ada kemudahan”
(QS. Al-Insyirah:5)**

LEMBAR PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil'aalamiin. Dengan senantiasa memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT beserta Nabi Muhammad SAW sehingga dapat melaksanakan pencarian ilmu dan dapat menyelesaikannya dengan baik.

Dengan rasa syukur yang mendalam, kupersembahkan tulisan karya ini kepada :

1. Kedua orang tuaku, Abah Achmad Husnus Sidqi dan Ummi Anis Sururin yang senantiasa menjadi penguat serta memberi dukungan yang terbaik dalam bentuk doa, ridha, semangat dan kasih sayang yang tak pernah putus, sehingga dapat menyelesaikan studi dengan baik. *Thankyou for being my anchor in this storm sea of life.*
2. Adik perempuanku Safinatur Rohmah dan Inayah Hayatun Nafisah yang memberi dukungan dan yang telah menjadi penghilang penat ketika pulang ke rumah.
3. Ibu Meilina Ratna D, S.Kep., NS., M.Kep dan Ibu apt. Siti Maimunah, M.Farm selaku dosen pembimbing yang sangat memberikan arahan dan pengalaman yang berharga. Serta kepada Ibu Fidia Rizkiah Inayatilah, S.ST., M.Keb selaku penguji dan Bapak apt. Hajar Sugihantoro, M.P.H. selaku penguji agama yang telah banyak memberikan masukan.
4. Bapak Yuwono, S.Sos selaku admin jurusan Farmasi yang sabar dan banyak membantu kapanpun saja selama menjalani proses perkuliahan.
5. *My Unbiological Sister*, Salma Sari Dewi yang banyak menemani, menghibur saat kondisi terpuruk, pendengar keluh kesah dan teman berpetualang.
6. Ciwi-ciwi “Rumahku Surgaku” Ivana Ifadayanti, Adhin Muiza Keswanty, Yudintya Aisyah Ermandy, Widhi Astuti, Nurista Safa Normasilla yang banyak memberikan kehebohan, semangat, dan menjadi teman berbagi kisah kasih kehidupan perkuliahan.
7. Ivana Ifadayanti dan Badrun Marsyahid Badu yang menjadi teman dari awal kuliah, diskusi dan berbagi berbagai macam ilmu, pendengar keluh kesah, serta teman berpetualang selama masa perkuliahan.
8. Teman-teman riset biomedik yang memberi semangat dan saling menguatkan.
9. Teman-teman Farmasi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang 2017 terutama “Keluarga Samawa” yang memberikan banyak warna selama menempuh perkuliahan.
10. Diriku sendiri yang berusaha melawan rasa malas dan berjuang hingga di titik sekarang.
11. Semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu.

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas rahmat, hidayah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Pengaruh Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica Granatum L.*) Terhadap Jumlah Folikel Ovarium Mencit Betina yang Diberi Paparan Formaldehid”. Skripsi ini dibuat sebagai salah satu persyaratan tugas akhir pada Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Penulis menyadari bahwa pada penyusunan skripsi tidak akan selesai tanpa bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. H. Abdul Haris, M.Ag. selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati P. W, M.Kes, Sp Rad(K). selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. apt. Abdul Hakim, M.P.I, M.Farm. selaku ketua Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. apt. Siti Maimunah, M.Farm. selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam penulisan proposal penelitian tersebut.
5. Meilina Ratna Dianti, S. Kep., NS., M. Kep. selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan saran dalam penulisan proposal penelitian tersebut.
6. Yuwono, S.Sos. selaku Admin Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
7. Segenap Laboran Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmunya kepada penulis selama ini.
8. Segenap Dosen Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmunya kepada penulis selama ini.
9. Orang tua serta saudara-saudara penulis atas doa, dukungan, serta kasih saying yang selalu tercurahkan selama ini.
10. Teman-teman satu angkatan yang selalu memberikan motivasi, dukungan, serta semangat kepada penulis selama ini.
11. Seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan proposal penelitian, baik secara langsung maupun tidak langsung.

Demikian skripsi ini penulis susun dengan sebaik-baiknya. Penulis sangat menyadari bahwa masih terdapat banyak kekurangan dalam penulisan skripsi

tersebut. Oleh karena itu, penulis membutuhkan kritik dan saran yang membangun yang akan berguna dalam penelitian-penelitian lainnya.

Akhir kata, semoga segala bantuan dan do'a dibalik penulisan skripsi ini menjadi berkah serta mendapat pahala dari Allah SWT.

Wassalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Malang, 11 Juni 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	ii
MOTTO	v
LEMBAR PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
ABSTRAK	xviii
ABSTRACT	xix
مستخلص البحث	xx
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	7
1.4.2 Manfaat Praktis	7
1.5 Batasan Masalah.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Tinjauan Tanaman Delima Merah (<i>Punica granatum L.</i>).....	9
2.1.1 Deskripsi Tanaman Delima Merah	9
2.1.2 Klasifikasi Delima Merah.....	10
2.1.3 Morfologi Delima Merah.....	10
2.1.4 Kandungan Senyawa Aktif Delima Merah.....	11
2.2 Antioksidan.....	12
2.2.1 Vitamin C.....	14

2.3	Formaldehid.....	16
2.3.1	Metabolisme Formaldehid	18
2.4	Radikal Bebas.....	19
2.5	Ovarium.....	21
2.5.1	Anatomi dan Fisiologi Ovarium	21
2.5.2	Histologi Ovarium	23
2.5.3	Perkembangan Folikel (Folikulogenesis)	23
2.5.4	Siklus Reproduksi Mencit.....	28
2.5.5	Siklus Hormon pada Mencit	31
2.6	Bahaya Formaldehid terhadap Folikel Ovarium	32
2.7	Metode Identifikasi Senyawa dalam Ekstrak	34
2.7.1	Metode Identifikasi dengan Uji Warna.....	34
2.7.1.1	Identifikasi Flavonoid	34
2.7.1.2	Identifikasi Gugus Fenol	34
2.7.1.3	Identifikasi Tanin	35
2.7.2	Metode Identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	35
2.8	Metode Terhadap Sampel.....	36
2.8.1	Metode Ekstraksi	36
2.8.2	Metode Maserasi.....	37
2.9	Hewan Coba Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	38
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....		42
3.1	Kerangka Konseptual	42
3.2	Uraian Kerangka Konsep	43
3.3	Hipotesis.....	44
BAB IV METODE PENELITIAN		45
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian.....	45
4.2	Waktu dan Tempat Penelitian	45
4.3	Populasi dan Sampel.....	46
4.3.1	Populasi.....	46
4.3.2	Sampel Penelitian	46
4.3.3	Jumlah Sampel Penelitian.....	47
4.4	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	47
4.4.1	Variabel Penelitian.....	47
4.4.2	Definisi Operasional Variabel	48

4.5	Alat dan Bahan Penelitian	50
4.5.1	Alat-Alat Penelitian	50
4.5.2	Bahan-Bahan Penelitian.....	50
4.6	Prosedur Penelitian.....	51
4.6.1	Alur Penelitian	51
4.6.2	Proses Tanaman	52
4.6.2.1	Ekstraksi.....	52
4.6.2.2	Pengujian.....	53
4.6.2.2.1	Identifikasi Flavonoid.....	53
4.6.2.2.2	Identifikasi Gugus Fenol	53
4.6.2.2.3	Identifikasi Tanin.....	54
4.6.2.2.4	Uji Kromatografi Lapis Tipis	55
4.6.3	Proses Hewan Coba	56
4.6.3.1	Persiapan	56
4.6.3.2	Kelompok Perlakuan.....	56
4.6.3.3	Pemeriksaan Fase pada Siklus Mencit	57
4.6.3.4	Tahap Pembedahan Mencit	57
4.6.3.5	Tahap Pengamatan dan Perhitungan Sampel	58
4.7	Analisis Data dan Pengolahan Data	58
4.7.1	Uji Normalitas Data	58
4.7.2	Uji Homogenitas Data	59
4.7.3	Uji <i>One Way</i> ANOVA (Analytical of Variance).....	59
4.7.4	Uji LSD (Least Significant Difference).....	60
BAB V	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	61
5.1	Determinasi Tanaman.....	61
5.2	Pembuatan Ekstrak Buah Delima Merah	62
5.2.1	Penyiapan Simplisia.....	62
5.2.2	Pembuatan Ekstrak	63
5.3	Uji Warna dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	65
5.3.1	Uji Warna.....	65
5.3.1.2	Uji Senyawa Gugus Fenol.....	66
5.3.1.3	Uji Senyawa Tanin.....	67
5.3.2	Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	68

5.4 Hasil Analisis Data Jumlah Folikel Ovarium.....	70
5.4.1 Hasil Analisis Data Jumlah Folikel Primer.....	70
5.4.2 Hasil Analisis Data Jumlah Folikel Sekunder	74
5.4.3 Hasil Analisis Data Jumlah Folikel Tersier	78
5.4.4 Hasil Analisis Data Jumlah Folikel <i>de Graaf</i>	82
5.5 Pengaruh Ekstrak Buah Delima Merah terhadap Jumlah Folikel Ovarium	85
5.6 Integrasi Al-Qur'an	91
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	93
6.1 Kesimpulan.....	93
6.2 Saran	93
DAFTAR PUSTAKA	94
LAMPIRAN.....	102

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Delima merah (<i>Punica granatum L.</i>)	10
Gambar 2. 2 Struktur kimia formaldehid	16
Gambar 2. 3 Metabolisme formaldehid	18
Gambar 2. 4 Anatomi ovarium.....	22
Gambar 2. 5 Histologi ovarium.....	23
Gambar 2. 6 Perkembangan folikel (folikulogenesis).....	24
Gambar 2. 7 Fotomikrograf stadium awal folikulogenesis preantral.....	26
Gambar 2. 8 Folikel sekunder	26
Gambar 2. 9 Fotomikrograf dari folikel tersier	27
Gambar 2. 10 Folikel <i>de Graaf</i>	27
Gambar 2. 11 Karakteristik fase reproduksi mencit.....	31
Gambar 2. 12 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	38
Gambar 3. 1 Kerangka konsep	42
Gambar 5. 1 Ekstrak kental delima merah (<i>Punica granatum L.</i>)	64
Gambar 5. 2 Hasil positif uji flavonoid.....	66
Gambar 5. 3 Hasil positif uji fenol.....	67
Gambar 5. 4 (A) Hasil positif uji tanin FeCl ₃ (B) Hasil positif uji tanin gelatin ..	68
Gambar 5. 5 Hasil KLT (NaNO ₂ : warna merah kecoklatan).....	69
Gambar 5. 6 Hasil KLT (Vanillin: warna merah).....	69
Gambar 5. 9 Histologi folikel primer ovarium.....	70
Gambar 5. 10 Histologi folikel sekunder ovarium.....	75
Gambar 5. 11 Histologi folikel tersier ovarium	79
Gambar 5. 12 Histologi folikel <i>de Graaf</i> ovarium.....	82

DAFTAR TABEL

Tabel 4. 1 Definisi operasional	48
Tabel 5. 1 Hasil rendemen ekstrak kental delima merah (<i>Punica granatum L.</i>) ..	65
Tabel 5. 2 Hasil perhitungan jumlah folikel primer	71
Tabel 5. 3 Hasil uji normalitas	71
Tabel 5. 4 Hasil uji homogenitas.....	72
Tabel 5. 5 Hasil uji <i>One Way</i> ANOVA.....	72
Tabel 5. 6 Hasil uji <i>Post Hoc</i> LSD.....	73
Tabel 5. 7 Hasil notasi <i>Post Hoc</i> LSD	74
Tabel 5. 8 Hasil perhitungan jumlah folikel sekunder	75
Tabel 5. 9 Hasil uji normalitas	76
Tabel 5. 10 Hasil uji homogenitas.....	76
Tabel 5. 11 Hasil uji <i>One Way</i> ANOVA.....	77
Tabel 5. 12 Hasil uji <i>Post Hoc</i> LSD.....	78
Tabel 5. 13 Hasil notasi <i>Post Hoc</i> LSD	78
Tabel 5. 14 Hasil perhitungan jumlah folikel tersier.....	79
Tabel 5. 15 Hasil uji normalitas	80
Tabel 5. 16 Hasil uji homogenitas.....	81
Tabel 5. 17 Hasil uji Kruskal Wallis	81
Tabel 5. 18 Hasil perhitungan jumlah folikel <i>de Graaf</i>	83
Tabel 5. 19 Hasil uji normalitas	83
Tabel 5. 20 Hasil uji homogenitas.....	84
Tabel 5. 21 Hasil uji Kruskal Wallis.....	84

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan Dosis.....	102
Lampiran 2 Langkah Pembuatan Larutan Uji.....	108
Lampiran 3 Tabel Pengamatan Jumlah Folikel Ovarium	110
Lampiran 4 Data Analisis Statistik Jumlah Folikel Ovarium	113
Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian.....	119
Lampiran 6 Determinasi Tanaman.....	123
Lampiran 7 Ethical Clearance.....	124

DAFTAR SINGKATAN

ACTH	= <i>Adrenocorticotropin Hormone</i>
ADH ₁	= <i>Alcohol dehydrogenase</i>
ADH ₃	= <i>Alcohol dehydrogenase 3</i>
ALDH ₂	= <i>Aldehyde dehydrogenase 2</i>
ATSDR	= <i>Agency for Toxic Substances & Disease Registry</i>
BHA	= <i>Butyted hydrokxyanisole</i>
BHT	= <i>Butyted hydrokxytoluene</i>
BNT	= <i>Beda Nyata Terkecil</i>
BPOM	= <i>Badan Pengawasan Obat dan Makanan</i>
CAT	= <i>Katalase</i>
CO	= <i>Carbon monoxide</i>
CRH	= <i>Corticotropine Releasing Hormone</i>
DNA	= <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
FeCl ₃	= <i>Besi (III) Klorida</i>
FSH	= <i>Follicle stimulating hormone</i>
GnRH	= <i>Gonadotropin Releasing hormon</i>
GPx	= <i>Glutation peroksidase</i>
GSH	= <i>Glutathione</i>
H ₂ O ₂	= <i>Hidrogen Peroksida</i>
HCl	= <i>Hidrogen Klorida</i>
HE	= <i>Hematoxylin Eosin</i>
HPA	= <i>Hipotalamus Pituitary Adrenal</i>
KCl	= <i>Kalium Klorida</i>
KLT	= <i>Kromatografi Lapis Tipis</i>
LDL	= <i>Low Density Lipoprotein</i>
LH	= <i>Luteinizing hormone</i>
LSD	= <i>Least Significance Different</i>
Na-CMC	= <i>Natrium – Carboxymethyle Cellulose</i>
NaNO ₂	= <i>Natrium Nitrit</i>
PG	= <i>Propyl gallate</i>

RNS = *Reactive Nitrogen Spesies*
ROS = *Reactive Oxygen Spesies*
SOD = *Superoksida disImutase*
TBHQ = *Tertiarybutyl hydroquinone*

ABSTRAK

Fathoniyah, Arien Alvi. 2021. Pengaruh Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica Granatum L.*) Terhadap Jumlah Folikel Ovarium Mencit Betina yang Diberi Paparan Formaldehid. Skripsi. Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: apt. Siti Maimunah, M.Farm.; Pembimbing II: Meilina Ratna Dianti, S.Kep., NS., M.Kep.

Formaldehid merupakan golongan aldehida yang mempunyai reaktivitas tinggi terhadap makromolekuler seperti DNA, lipid, dan protein. Paparan formaldehid dalam tubuh secara berlebihan menyebabkan radikal bebas yang akan membuat kerusakan pada organ reproduksi wanita dengan ditandainya penurunan jumlah folikel ovarium. Buah delima merah (*Punica granatum L.*) memiliki efek antioksidan tinggi karena adanya senyawa flavonoid, fenol, dan tanin. Senyawa yang terdapat pada buah delima merah memiliki gugus hidroksil yang mampu mengikat radikal bebas dengan cara mendonorkan elektronnya. Tujuan umum dari penelitian ini adalah mengetahui adanya kandungan senyawa flavonoid, fenol, dan tanin melalui uji warna dan KLT serta mengetahui pengaruh ekstrak buah delima merah (*Punica granatum L.*) terhadap jumlah folikel ovarium mencit betina yang telah dipapar formaldehid. Metode penelitian ini menggunakan metode *true experiment post test-only control group design* yang terbagi menjadi 5 kelompok yaitu, kontrol negatif diberikan formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB, kontrol positif diberikan formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan vitamin C dosis 1,3 mg/20gBB. Kelompok perlakuan 1, 2, 3 diberikan formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dengan dosis berturut-turut 18,2 mg/20gBB; 36,4 mg/20gBB dan 72,8 mg/20gBB per oral selama 14 hari. Identifikasi buah delima merah dengan uji warna diperoleh hasil positif yang menunjukkan kandungan senyawa flavonoid, fenol, dan tanin serta dengan uji KLT diperoleh hasil positif yang menunjukkan kandungan ellagitanin. Analisis data penelitian ini menggunakan *One-Way ANOVA* dilanjutkan dengan *Post-Hoc LSD* dan *Kruskal Wallis*. Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat pengaruh ekstrak buah delima merah terhadap folikel primer dan folikel sekunder dengan nilai signifikansi atau *p-value* pada jumlah folikel primer sebesar 0,000 (berbeda signifikan), pada jumlah folikel sekunder sebesar 0,003 (berbeda signifikan). Hasil penelitian ini menunjukkan tidak terdapat pengaruh ekstrak buah delima merah terhadap folikel tersier dan folikel *de Graaf* dengan nilai signifikansi atau *p-value* pada jumlah folikel tersier didapatkan 0,292 (tidak berbeda signifikan), pada jumlah folikel *de Graaf* didapatkan 0,128 (tidak berbeda signifikan). Pemberian ekstrak buah delima merah (*Punica granatum L.*) berpengaruh terhadap jumlah folikel primer dan folikel sekunder tetapi tidak berpengaruh terhadap jumlah folikel tersier dan folikel *de Graaf*.

Kata Kunci: *Punica granatum L.*, formaldehid, ovarium, folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, folikel *de Graaf*

ABSTRACT

Fathoniyah, Arien Alvi. 2021. Effect of Red Pomegranate Extract (*Punica Granatum L.*) on the Number of Ovarian Follicles in Female Mice that Exposed by Formaldehyde. Undergraduate Thesis. Department of Pharmacy, Faculty of Medicine and Health Sciences, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang. Advisor I: apt. Siti Maimunah, M.Farm.; Advisor II: Meilina Ratna Dianti, S.Kep., NS., M.Kep.

Formaldehyde is an aldehydes group that has a high reactivity to macromolecules such as DNA, lipids, and proteins. Excessive formaldehyde exposure inside the body because of free radicals damage the female reproductive organs follicles number. Red pomegranate (*Punica granatum L.*) has a high antioxidant effect because of flavonoids, phenols, and tannins. These compounds have a hydroxyl group that can bind the free radicals by transferring electrons. This study focuses to dig out the flavonoids, phenols, and tannis inside the red pomegranate (*Punica granatum L.*) extract through color and TLC test and find the effect of red pomegranate (*Punica granatum L.*) extract on the number of follicles ovarian that are exposed by formaldehyde. The study was conducted through an experiment post test only control group design method that divided into five groups, those are negative control was given 2,8 mg/20gBB of formaldehyde dose, positive control was given 2,8 mg/20gBB of formaldehyde dose and 1,3 mg/20gBB of vitamin C. The first, second, and third group was given 18,2 mg/20gBB; 36,4 mg/20gBB; 72,8 mg/20gBB orally in 14 days. The identification of red pomegranate through color and the TLC test showed positive result. The data analyzed by *One-Way ANOVA* followed by *Post-Hoc LSD* and *Kruskal Wallis*. The result of this study showed the effect of red pomegranate extract on primary and secondary follicles with a p-value on the number of primary follicles is 0.000 (significantly different) and the number of secondary follicles is 0.003 (significantly different). The result also showed that giving red pomegranate extract not affected tertiary and *de Graaf* follicles with a p-value on the number of tertiary follicles are 0.292 (not significantly different) and the number of *de Graaf* follicles is 0.128 (not significantly different). Giving red pomegranate extract (*Punica granatum L.*) affected primary and secondary ovarian follicles but not affected to tertiary and *de Graaf* ovarian follicles.

Keywords: *Punica granatum L.*, formaldehyd, ovary, primary follicles, secondary follicles, tertiary follicles, folikel *de Graaf* follicles

مستخلص البحث

فطانية، آرين ألفي. ٢٠٢١. أثر مستخرجة الرمان الأحمر (*Punica Granatum L.*) على عدد من بصيالات المبيض الفئران الإناث التي تعرضت بالفورمالدهيد. البحث الجامعي. قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحية بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: سيتي ميمونة، الماجستير. المشرف الثاني: ميلينا راتنا ديانتي، الماجستير.

الفورمالدهيد هو مجموعة من ألدهيدات التي لديها تفاعلات عالية مع الجزيئات الكبيرة مثل الحمض النووي الصبغي والدهون والبروتينات. التعرض المفرط للفورمالدهيد في الجسم يسبب الجذور الحرة التي تسبب ضررا للأعضاء التناسلية الأنثوية مع انخفاض ملحوظ في عدد بصيالات المبيض. فاكهة الرمان الحمراء (*Punica granatum L.*) لها أثر مضادة الأكسدة عاليا بسبب وجود مركبات الفلافونويد، الفينولات، والعفص. المركبات الموجودة في الرمان الأحمر لديها مجموعات الهيدروكسيل التي تقدر على ربط الجذور الحرة عن طريق التبرع بالإلكترونات. الهدف العام من هذا البحث هو معرفة محتوى الفلافونويدات والفينولات والعفص من خلال اختبارات الألوان و استشراب طبقة رقيقة ومعرفة أثر مستخرجة الرمان الأحمر على عدد بصيالات المبيض الفئران الإناث التي تعرضت للفورمالدهيد. طريقة البحث المستخدمة لهذا البحث هي التجربة الحقيقية مع تصميم مجموعة التحكم بالاختبار البعدي مما ينقسم إلى خمس مجموعات وهي؛ أعطيت مجموعة التحكم السلبية الفورمالدهيد بالجرعة ٢.٨ ملغ / ٢٠ جرام من وزن، وأعطيت مجموعة التحكم الإيجابية الفورمالدهيد بالجرعة السامة ٢.٨ ملغ / ٢٠ جرام من وزن الفئران وفيتامين ج ١.٣ ملغ / ٢٠ جرام من وزن الفئران. وأما مجموعات العلاج ١، ٢، ٣ فأعطيت الفورمالدهيد بالجرعة ٢.٨ ملغ / ٢٠ جرام من وزن الفئران و مستخرجة الرمان الأحمر بجرعات متتالية ١٨.٢ ملغ / ٢٠ جرام من وزن الفئران، ٣٦.٤ ملغ / ٢٠ جرام من وزن الفئران، و ٧٢.٨ ملغ / ٢٠ جرام من وزن الفئران عن طريق الفم لمدة ١٤ يوما. تم تحديد الرمان الأحمر مع اختبار اللون و استشراب الطبقة الرقيقة مما وجد نتائج إيجابية، وأظهرت محتوى مركبات الفلافونويد والفينولات والعفص. واستمر تحليل هذه البيانات البحثية باستخدام تحليل التباين بأحادي الاتجاه ثم اتبعه *Kruskal Wallis* و *Post-Hoc LSD*. وأظهرت النتائج أن هناك أثر مستخرجة الرمان الأحمر على البصيالات الأولية والبصيالات الثانوية؛ في عدد البصيالات الأولية قيمة أهمية ٠.٠٠٠ (يختلف إلى حد كبير)، وفي عدد البصيالات الثانوية قيمة أهمية ٠.٠٠٣ (يختلف إلى حد كبير). وأشارت نتائج هذه الدراسة إلى عدم وجود التأثير من مستخرجة الرمان الأحمر على بصيالات الثالثة وبصيالات دي غراف. قيمة أهمية ٠.٢٩٢ في عدد بصيالات الثالثة (لا يختلف إلى حد كبير)، وفي عدد بصيالات دي غراف قيمة أهمية ٠.١٢٨ (لا يختلف إلى حد كبير).

الكلمات الرئيسية: الرمان الأحمر (*Punica granatum L.*)، الفورمالدهيد، المبيضين، البصيالات الأولية، البصيالات الثانوية،

البصيالات الثالثة، البصيالات دي غراف

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infertil merupakan suatu hasil biologik suami istri yang tidak menghasilkan kehamilan dan kelahiran bayi (Rahmatullah, 2016). Infertilitas masih menjadi masalah kesehatan dunia termasuk di Indonesia, berdampak pada kehidupan keluarga karena menyebabkan masalah medis dan psikologis (Hestiantoro *et al*, 2013). *World Health Organization* (WHO) secara global memperkirakan adanya kasus infertil $\pm 10\%$ pada pasangan, jika dari gambaran global populasi maka sekitar 50-80 juta pasangan (1 dari 7 pasangan) atau sekitar 2 juta pasangan infertil baru setiap tahun dan jumlah ini terus meningkat (Triwani, 2013). Prevalensi pasangan infertil di Indonesia tahun 2013 adalah 15-25% dari seluruh pasangan yang ada (Riskesmas, 2013).

Kejadian infertilitas 20% dari pihak pria disebabkan karena sperma yang abnormal, kelainan anatomi, gangguan endokrin dan disfungsi seksual. Sedangkan kejadian infertil dari pihak wanita menyumbang sebesar 65%, dan 15% kondisi lainlain dan tidak diketahui. Wanita menjadi infertil disebabkan oleh banyak faktor diantaranya, usia, pekerjaan, tingkat stres, body mass index kaitannya dengan status gizi dan kelainan organ reproduksi seperti gangguan ovulasi, gangguan tuba dan pelvis, serta gangguan uterus (HIFERI, 2013). Sebagian besar masalah infertilitas pada wanita disebabkan oleh gangguan ovulasi (50,3%) (Masoumi *et al*, 2015). Gangguan ovulasi terjadi karena adanya gangguan folikulogenesis sehingga folikel tidak berkembang dan mengalami atresia. Atresia folikel disebabkan adanya apoptosis dan stres oksidatif (Agarwal *et al*, 2012).

Stres oksidatif terjadi karena jumlah radikal bebas di dalam tubuh berlebihan, disebabkan karena berbagai zat kimia dalam makanan (Muchtadi, 2013). Penyalahgunaan zat kimia pada makanan diantaranya formaldehid. Formaldehid merupakan golongan aldehida yang mempunyai reaktivitas tinggi terhadap makromolekuler seperti DNA, lipid, dan protein. Formaldehid biasanya digunakan untuk pewarnaan kayu, besi, cat, lubrikan, dan pada jumlah yang lebih kecil, formaldehid digunakan sebagai bahan fiksasi di laboratorium biologi. Umumnya formaldehid sering dibuat dalam larutan 37% disebut dengan formalin. Penggunaan formalin sebagai pengawet makanan telah dilarang oleh pemerintah melalui Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 33 Tahun 2012 tentang Bahan Tambahan Pangan (Kemenkes RI, 2012). Akan tetapi, berdasarkan hasil investigasi yang telah dilakukan BPOM (Balai Besar Pengawas Obat dan Makanan), masih banyak ditemukan sejumlah produk pangan yang mengandung formalin. Produk pangan yang mengandung formalin itu dijual di pasar tradisional dan supermarket di berbagai wilayah Indonesia. (Purawisastra dan Emma, 2011).

Menurut BPOM (2019), formalin merupakan bahan tambahan pangan yang menempati urutan ketiga tertinggi di Indonesia setelah rhodamin B dan boraks. Dari 517 sampel yang tidak memenuhi syarat untuk dikonsumsi terdapat 146 sampel (27,7%) mengandung formalin. Produk pangan berformalin tersebut yang sering dijumpai adalah tahu, mie basah, dan ikan. Berdasarkan hasil sampling dan pengujian BPOM (2017) yang dilakukan secara serial dan serentak di beberapa daerah Indonesia menunjukkan sebanyak 32% tahu, 62% mie basah, dan 6% ikan mengandung formalin.

Formaldehid sangat berbahaya jika tertelan, terhirup dan kontak langsung dengan kulit. Akibatnya akan timbul berupa bahaya kanker pada manusia, reaksi alergi, iritasi pada saluran pernafasan, dan luka bakar pada kulit. Paparan formaldehid terbukti dapat menyebabkan kerusakan di hampir seluruh organ yang ada di tubuh (Saito, 2005). Paparan formaldehid pada sistem reproduksi mencit betina dalam penelitian Krismayanti (2009) menggunakan dosis 140mg/Kg BB/hari selama 12 hari menunjukkan bahwa menurunnya jumlah folikel tersier dan folikel *de graaf*. Selain itu menurut penelitian Anggraini (2017) paparan formaldehid menggunakan dosis 140mg/Kg BB/hari selama 12 hari dapat mempengaruhi folikulogenesis ovarium mencit betina.

Metabolisme formaldehid dalam tubuh menjadi asam format oleh *Aldehyde dehydrogenase 2* (ALDH₂) yang berada di mitokondria sel dan oleh *Alcohol dehydrogenase 3* (ADH₃) yang berada di sitosol. Melalui tahapan metabolisme ini, pembentukan asam format ini secara langsung mengurangi jumlah antioksidan alami dalam tubuh berupa *glutathione* (GSH) (Teng *et al.*, 2001). Penurunan antioksidan *glutathione* (GSH) sebagai antioksidan endogen menyebabkan peningkatan terbentuknya radikal bebas (Tulpule *et al.*, 2013). Sehingga memerlukan antioksidan eksogen untuk menetralkan radikal bebas (Adawiah, 2015).

Antioksidan eksogen dapat kita temukan pada buah-buahan atau sayur-sayuran untuk meminimalisir ataupun menangkal senyawa ataupun zat berbahaya bagi kesehatan. Al-Qur'an telah seringkali membahas mengenai tanaman sebagai bukti kekuasaan Allah SWT serta perumpamaan untuk menyampaikan hikmah. Di

dalam Al-Qur'an kata delima muncul tiga kali. Salah satu ayat yang menyebutkan kata delima pada surat Al-An'am ayat 99 sebagai berikut:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرَجُ
 مِنْهُ حَبًّا مُمْتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ
 وَالرَّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ^{قُلْ} أَنْظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكَمْ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ
 يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

Artinya: “Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan. Maka Kami Keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjualai, dan kebun-kebun anggur, dan (kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman” (QS. Al-An'am: 99).

Dalam kitab tafsir Al-Maraghi menjelaskan bahwa Allah SWT lah yang menurunkan air hujan dari awan. Kemudian dengan air tersebut Allah SWT mengeluarkan tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam bentuk, ciri, khas, serta perbedaannya. Allah SWT tumbuhkan biji-bijian yang banyak, kebun-kebun anggur, buah zaitun, dan juga delima, serupa dalam bentuk, daun, dan buahnya; tetapi berbeda dalam warna buah dan rasanya. Allah SWT memerintahkan kepada umat manusia untuk membanding-bandingkan sifat-sifatnya itu, agar manusia memahami dan mengetahui dengan jelas kelembutan, pengaturan, dan kebijaksanaan Allah dalam setiap perhitungan-Nya dan merujuk kepada kewajiban untuk mentauhidkan-Nya. Ini adalah tanda kekuasaan/kebesaran Allah SWT agar kita berfikir (tadabbur) atas ciptaan Allah SWT dan menambah keimanan kita. Oleh sebab itu, tumbuh-tumbuhan yang diciptakan Allah SWT pasti memiliki manfaat

bagi kehidupan dan segala sesuatu yang terdapat di alam semesta tidak akan ada yang sia-sia bagi seluruh makhluk-Nya (Al-Maraghi, 1993).

Delima merah (*Punica granatum* L.) adalah suatu tumbuhan dalam famili Punicaceae. Bagian dari tumbuhan delima merah sangat sering digunakan oleh masyarakat Indonesia yaitu buah dalam keadaan matang. Komponen yang terdapat dalam bagian dari buah delima merah berupa daging, biji, dan kulit yang memiliki efek terapeutik terhadap manajemen kesehatan. Penggunaan buah delima merah dapat dipergunakan dalam bentuk segar, simplisia, maupun ekstrak yang dikeringkan dalam kurun waktu tertentu. Buah delima merah dimanfaatkan dalam terapi pengobatan sebagai antioksidan, analgesik, antiinflamasi, antibakteri, antifungi, antivirus, dan lain sebagainya (Rahmani *et al.*, 2017).

Buah delima merah dikenal dengan aktivitas antioksidan kuat yang mampu mencegah atau mengobati berbagai kerusakan akibat stres oksidatif sehingga mampu melindungi kerusakan organ melalui mekanisme antioksidan (Harling, 2019). Aktivitas antioksidan dibuktikan pada penelitian Resti (2020) tentang uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol buah delima merah menggunakan metode DPPH mendapatkan nilai IC_{50} sebesar 9,58 ppm yang menunjukkan ekstrak etanol buah delima merah memiliki aktivitas antioksidan kategori sangat kuat. Pada buah delima merah memiliki kandungan antioksidan tinggi yakni 92% dari total antioksidan karena bagian ini kaya akan kandungan polifenol yang terdiri dari flavonoid (antosianin, katekin, dan flavonoid kompleks lainnya) dan tanin terhidrolisis (punicalagin, pedunculagin, punicalagin, ellagic acid) (Aviram *et al.*, 2008). Punicalagin yang merupakan satu-satunya jenis polifenol yang ditemukan

pada delima merah. Punicallagin merupakan bagian dari ellagitanin dan akan dihidrolisis menjadi ellagic acid untuk memudahkan penyerapan dalam tubuh (Seeram *et al.*, 2005). Selain itu, pada kulit delima merah mengandung 20-30% ellagitanin dan telah diteliti sebagai antioksidan yang kuat (Siahaan *et al.*, 2017).

Berdasarkan penjelasan tersebut, maka peneliti ingin mengetahui pengaruh pemberian ekstrak delima merah (*Punica granatum L.*) terhadap jumlah folikel ovarium mencit betina yang diberikan paparan formaldehid.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat senyawa golongan flavonoid, fenol, dan tanin dalam ekstrak buah delima merah (*Punica granatum L.*) yang diidentifikasi menggunakan uji warna?
2. Apakah terdapat senyawa golongan ellagitanin dalam ekstrak buah delima merah (*Punica granatum L.*) yang diidentifikasi menggunakan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)?
3. Apakah ekstrak buah delima merah (*Punica granatum L.*) berpengaruh terhadap jumlah folikel ovarium mencit betina yang telah dipapar formaldehid?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui adanya kandungan senyawa golongan flavonoid, fenol, dan tanin dalam ekstrak buah delima merah (*Punica granatum L.*) yang diidentifikasi menggunakan uji warna?

2. Mengetahui adanya senyawa golongan ellagitanin dalam ekstrak buah delima merah (*Punica granatum* L.) yang diidentifikasi menggunakan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)?
3. Mengetahui pengaruh ekstrak buah delima merah (*Punica granatum* L.) terhadap jumlah folikel ovarium mencit betina yang telah dipapar formaldehid.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh ekstrak buah delima merah (*Punica granatum* L.) terhadap jumlah folikel primer yang telah dipapar formaldehid.
2. Mengetahui pengaruh ekstrak buah delima merah (*Punica granatum* L.) terhadap jumlah folikel sekunder yang telah dipapar formaldehid.
3. Mengetahui pengaruh ekstrak buah delima merah (*Punica granatum* L.) terhadap jumlah folikel tersier yang telah dipapar formaldehid.
4. Mengetahui pengaruh ekstrak buah delima merah (*Punica granatum* L.) terhadap jumlah folikel *de Graaf* yang telah dipapar formaldehid.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi maupun ilmu pengetahuan baru tentang pengaruh ekstrak buah delima merah (*Punica granatum* L.) sebagai antioksidan dalam aktivitasnya menanggulangi radikal bebas.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi pertimbangan dan pengembangan dalam pemilihan buah delima merah (*Punica granatum* L.) sebagai antioksidan

alami untuk dijadikan suplemen dalam menanggulangi radikal bebas khususnya yang disebabkan oleh radikal bebas dari formaldehid pada jumlah folikel ovarium.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Buah delima merah (*Punica granatum L.*) diperoleh dari Surabaya Flora Gallery.
2. Ekstrak delima merah (*Punica granatum L.*) menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% diberikan peroral menggunakan sonde.
3. Formaldehid diberikan dengan dosis toksik per oral menggunakan sonde.
4. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) galur Balb/c, jenis kelamin betina (hamil dan melahirkan), umur 3-4 bulan dan berat 20-30 gram.
5. Perlakuan pada hewan coba dilakukan selama 14 hari.
6. Pengujian kandungan antioksidan buah delima merah menggunakan uji reaksi warna dan kromatografi lapis tipis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tanaman Delima Merah (*Punica granatum L.*)

2.1.1 Deskripsi Tanaman Delima Merah

Delima merah (*Punica granatum L.*) merupakan suatu tanaman dalam famili Punicaceae yang berasal dari dataran Timur Tengah. Penyebaran tanaman delima merah telah mencapai Iran, Mediterania, Cina, Asia Tenggara, serta negara tropis lainnya. Adapun, negara Roma menyebut tanaman delima merah dengan nama “Malum Punicum” berarti apel punican dan dikenal melalui sebutan “*Punicum granatum* C. Von. Linneaus” atau “*Punica granatum*”. Tanaman delima merah dapat dikonsumsi secara langsung maupun diekstraksi dalam bentuk jus, minuman kaleng, selai, pasta, jelly, perisa makanan, dan lain-lain (Titin *et al.*, 2015).

Tanaman delima merah (*Punica granatum L.*) akan berwarna merah, berukuran kecil, dan berasa manis saat telah masak. Tanaman ini memiliki 1000 spesies yang tersebar di dalam alam semesta. Biji delima merah kaya akan lemak dengan kandungan berkisar 12-20% dari berat total biji tersebut. Komponen yang terdapat dalam minyak ini berupa asam lemak tidak terkonjugasi seperti asam linoleat, asam oleat, asam palmitatik, dan asam stearatik. Selain itu, biji delima merah juga mengandung asam elagic, asam punisatic, sterol, isoflavon, serta lignin yang sangat berperan aktif sebagai antioksidan. Maka, potensi antioksidan dalam delima merah sangat tinggi sekitar 92% (Titin *et al.*, 2015).

2.1.2 Klasifikasi Delima Merah

Klasifikasi dari tanaman delima merah (*Punica granatum* L.) adalah sebagai berikut (Setiawan, 2008) :

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Myrtales

Famili : Myrtaceae

Genus : Punica

Spesies : *Punica granatum* L.

2.1.3 Morfologi Delima Merah



Gambar 2. 1 Delima merah (*Punica granatum* L.) (Andriani, 2016)

Morfologi dari tanaman delima merah (*Punica granatum* L.) adalah termasuk ke dalam tanaman perdu yang memiliki tinggi sekitar 2-5 meter. Batangnya berkayu, ranting bersegi, percabangan banyak, berduri, berwarna coklat-hijau kotor. Daunnya tunggal berhadapan, tanpa daun penumpu, helaian daun berbentuk lonjong sampai lanset, pangkal lancip, ujung tumpul, tepi rata, pertulangan menyirip, dan warna hijau. Maka, daun mahkota berjumlah 5-7 dalam kuncup yang tidak beraturan (Andriani, 2016).

Bunga tanaman delima merah berbentuk aktinomorf terpisah disertai sumbu bunga berongga dengan bangun menyerupai kerucut. Benang sari berjumlah banyak dengan tangkai sari bebas dan kepala sari beruang dua. Bakal buah delima merah tenggelam, beruang banyak secara bertingkat, bagian bawah dengan bakal biji di ketiak, serta bagian atas dengan bakal biji di dalam dinding. Tangkai putik langsing dan hanya berjumlah satu. Buah delima merah berbentuk buni dengan tajuk-tajuk kelopak tidak gugur. Sehingga, biji yang terkandung dalam buah delima merah memiliki jumlah banyak dengan salut berair yang tidak terdapat pada bagian endosperm, lembaga daun, maupun lembaga tergulung (Andriani, 2016).

2.1.4 Kandungan Senyawa Aktif Delima Merah

Kelompok senyawa kimia utama dalam tanaman delima merah (*Punica granatum* L.) adalah polifenol yang terdiri dari flavonoid (antosianin, katekin, dan flavonoid kompleks lainnya), tanin terhidrolisis (ellagitanin, punicalagin, pedunculagin, punicalagin, ellagic acid) (Hernawati *et al.*, 2013). Pada buah delima merah memiliki kandungan antioksidan tinggi yakni 92% dari total antioksidan karena bagian ini kaya akan kandungan polifenol (Aviram *et al.*, 2008). Selain itu, pada kulit buah delima merah memiliki total kandungan 20-30% ellagitanin yang menjadi senyawa antioksidan paling kuat (Siahaan *et al.*, 2017).

Punicallagin yang merupakan satu-satunya jenis polifenol yang ditemukan pada delima merah. Punicallagin merupakan bagian dari ellagitanin dan akan dihidrolisis menjadi ellagic acid untuk memudahkan penyerapan dalam tubuh (Seeram *et al.*, 2005). Ellagitanin merupakan suatu golongan senyawa polifenol dengan turunan berupa tanin terhidrolisis dengan berbagai macam aktivitas biologis

seperti antioksidan, antikanker, antivirus, dan lain-lain. Umumnya, struktur utama dari ellagitannin terdiri dari inti gula pusat seperti D-glukosa yang berasal dari asam galat esterat (asam 3,4,5-trihydroxybenzoic) dan HHDP (ester asam hexahydroxy diphenolic). Maka, senyawa ini dapat dipecah menjadi asam galic saat dilarutkan ke dalam air secara keseluruhan (Takeuchi *et al.*, 2017).

Tanaman delima merah (*Punica granatum* L.) memiliki kemampuan dalam menunjukkan aktivitas antioksidan bagi tubuh. Hal ini dikarenakan adanya berbagai macam komponen senyawa kimia yang terkandung dalam kulit, buah maupun biji (Rahmani *et al.*, 2017). Antioksidan mampu memiliki aktivitas yang kuat dan berperan penting untuk mencegah efek negatif radikal bebas, selain itu juga memiliki aktivitas terapi lain yaitu memperbaiki sel-sel tubuh yang telah rusak. Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Anggraini (2017) pemberian ekstrak delima merah pada dosis bertingkat 100; 150; 200 mg/kg BB manusia per hari mampu berperan sebagai antioksidan dalam menurunkan ekspresi caspase-3 pada mencit (*Mus musculus*) yang dipapar formaldehid.

2.2 Antioksidan

Antioksidan adalah molekul yang mampu memperlambat atau mencegah oksidasi molekul lain. Antioksidan juga mengacu pada molekul yang mampu menstabilkan atau menonaktifkan radikal bebas sebelum mereka menyerang sel. Antioksidan dapat mentransfer elektron untuk menyeimbangkan molekul untuk proses detoksifikasi, menetralkan kelebihan ROS sehingga mencegah kerusakan struktur sel (Adawiah, 2015). Antioksidan bekerja melalui beberapa mekanisme, antara lain menangkap spesies yang menginisiasi peroksidasi, mengkhelat ion

logam sehingga mereka tidak mampu membentuk spesies reaktif atau mendekomposisi peroksida, memadamkan $\cdot\text{O}_2^-$ mencegah pembentukan peroksida, memutus reaksi berantai auto-oksidasi, dan menurunkan konsentrasi O_2 terlokalisasi. Karena kemampuannya tersebut, antioksidan memiliki sifat biologis yang beragam, misalnya efek antiinflamasi, antikarsinogen dan antiaterosklerosis, menurunkan insidensi penyakit koroner, dan menjaga kesehatan usus dengan modulasi kesetimbangan mikroba usus (Oroian dan Escriche, 2015).

Berdasarkan mekanisme aksinya dalam reaksi oksidasi berantai, antioksidan dapat diklasifikasikan sebagai primer (promotor pemutusan rantai) atau sekunder (pencegah). Antioksidan primer mentransfer atom hidrogen atau mendonasikan elektron untuk menghambat atau mengeliminasi radikal bebas yang terbentuk selama tahap inisiasi atau propagasi, sehingga menginaktivasi spesies reaktif dengan resonansi. Reaksi ini menghentikan reaksi oksidasi berantai dengan pembentukan senyawa stabil. Sedangkan antioksidan sekunder bekerja dengan cara memperlambat kecepatan oksidasi, seperti pembentukan kompleks dengan ion logam (misalnya besi dan tembaga) yang mengkatalisis oksidasi; menangkap oksigen dan mendeaktivasinya melalui enzim seperti katalase dan glukosa oksidase; menyerap UV, dan mendekomposisi hidrosiperoksida (Fernandes *et al.*, 2018).

Sementara berdasarkan sumbernya, terdapat 2 jenis kategori antioksidan, yaitu endogen dan eksogen. Antioksidan endogen dikembangkan oleh sistem biologis tubuh sendiri dan termasuk di dalamnya molekul dan enzim antioksidan seperti GSH peroksidase (GPx), katalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), GSH, dan albumin. Sementara antioksidan eksogen umumnya adalah antioksidan

dari makanan, di antaranya vitamin (vitamin C dan vitamin E), karotenoid (karoten dan xanthophyll) dan polifenol (flavonoid, asam fenolat, lignin dan stilben) (Singh *et al.*, 2017).

Antioksidan eksogen dapat diperoleh dalam bentuk sintesis dan alami. Antioksidan sintetis seperti *buthylatedhydroxytoluene* (BHT), *buthylated hidroksianisol* (BHA) dan *ters-butylhydroquinone* (TBHQ) secara efektif dapat menghambat oksidasi. Namun, penggunaan antioksidan sintetis dibatasi oleh aturan pemerintah karena, jika penggunaannya melebihi batas justru dapat menyebabkan racun dalam tubuh dan bersifat karsinogenik, sehingga dibutuhkan antioksidan alami yang aman. Salah satu sumber potensial antioksidan alami adalah tanaman karena mengandung senyawa flavonoid, polifenol, klorofil dan tannin (Lie, 2012).

2.2.1 Vitamin C

Vitamin C atau asam askorbat adalah kristal putih yang larut dalam air dengan rumus molekul $C_6H_8O_6$. Vitamin C merupakan agen reduktor yang efektif, mudah teroksidasi menjadi asam dehidroaskorbat. Reaksi vitamin C bersifat reversibel mudah dioksidasi dan direduksi. Sehingga vitamin C dapat melindungi zat lain dari proses oksidasi (bertindak sebagai antioksidan dalam tubuh) (Jauhari, 2013).

Vitamin C diperlukan untuk pembentukan antarsel yang menghubungkan kolagen protein. Vitamin C berperan dalam pembentukan tulang dan enamel serta dentin gigi. Kekurangan vitamin C mengakibatkan kondisi skorbut. Kondisi ini memiliki ciri-ciri yaitu penguraian mekanis dari kolagen, melemahnya ligamen dan terbukanya kembali luka dan goresan, perdarahan di bawah kulit dan dalam

jaringan lain, dan gusi bengkak dan berongga yang menyebabkan gigi goyang (Lean, 2013). Vitamin C mampu mengatasi tekanan darah tinggi, memperbaiki aktivitas hormon seks, mengatasi infertilitas, mengurangi keriput dan memperbaiki kolesterol darah. Sebagai antioksidan vitamin C mengurangi resiko kanker dengan mengurangi kerusakan akibat radikal bebas pada DNA memicu kanker (Jauhari, 2013).

Salah satu sifat yang membuat vitamin C sebagai antioksidan adalah rendahnya potensial reduksi satu elektron asam askorbat dan radikal askorbil sehingga dapat bereaksi dengan cara mereduksi ROS dan RNS termasuk superoksida, hidroksil, singlet oksigen, ozon, nitrogen oksida, radikal nitrosida, dan asam hipoklorous (Wijaya, 2011). Vitamin C memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang dapat menangkap radikal bebas didalam tubuh dan mencegah hiperpigmentasi. Vitamin C bertindak sebagai antioksidan non-enzimatis eksogen yang berperan dalam pertahanan primer terhadap oksigen reaktif. Dan vitamin C termasuk antioksidan sekunder (antioksidan non-enzimatis), yang disebut juga dengan sistem pertahanan preventif. Vitamin C memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau menangkap radikal bebas (*free radical scavenger*), kemudian mencegah reaktivitas amplifikasinya, sehingga tidak akan bereaksi dengan komponen seluler (Winarsi, 2011).

Menurut hasil penelitian yang dilakukan Syukriani (2000), Vitamin C dengan dosis optimum 500 mg mampu berperan sebagai antioksidan yang memberikan efek langsung dalam menurunkan kadar methemoglobin (metHb) darah yang berlebihan akibat radikal bebas yang berasal dari paparan CO. Didukung juga oleh

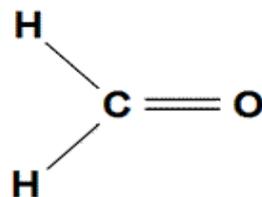
Pacier (2015), yang menyarankan konsumsi Vitamin C pada rentang dosis 60-500 mg per hari untuk mendapatkan efek antioksidan optimal. Ketika dilakukan percobaan lebih lanjut pada dosis 500 mg, menunjukkan bioavailabilitas yang paling optimal.

2.3 Formaldehid

Formaldehid merupakan golongan aldehida yang mempunyai reaktivitas tinggi terhadap makromolekuler seperti DNA dan protein (Lu *et al.*, 2010). Sinonim atau nama dagang formaldehid yaitu formalin, formol, methanal metthylene oxide, tetraoxymethalene, oxomethane, formalith, methyl aldehyde, formic aldehyde, methylene glycol, oxymenthylene. Berat molekul 30.02598 g/mol dengan rumus molekul H_2CO , CH_2O (Tangdiangga, 2015).

Formaldehid berbentuk gas, tidak berwarna dan mudah terbakar pada suhu ruangan. Zat ini memiliki bau menyengat dan dalam konsentrasi tinggi memberikan efek terbakar pada mata, hidung dan paru-paru. Formaldehid mudah larut dalam air, alkohol, eter dan aseton. Formaldehid sering digunakan dalam larutan metanol dikenal dengan formalin. Formalin terdiri dari formaldehid 37%, metanol 10% dan air 53 % (Nababan, 2018).

Struktur kimia formaldehid sebagai berikut :



Gambar 2. 2 Struktur kimia formaldehid (Fadhilah, 2017)

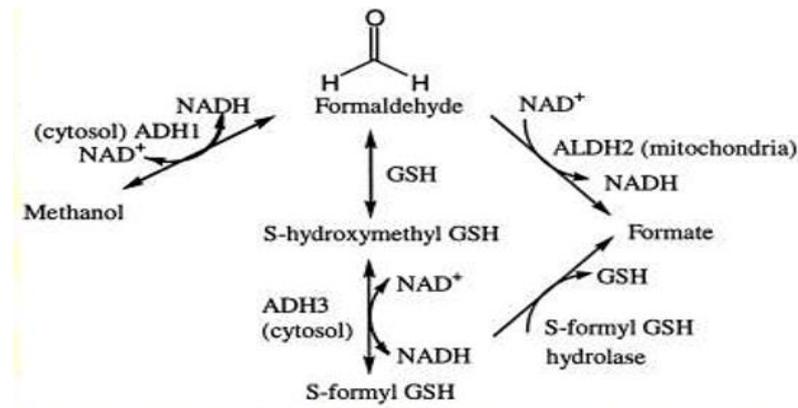
Formaldehid masuk ke dalam tubuh manusia dengan berbagai cara yaitu inhalasi, oral, dan kulit (perkutan). Formaldehid dapat berdifusi secara cepat dalam jaringan-jaringan ketika masuk ke dalam tubuh melalui rute oral atau intraperitoneal. Dalam rute oral, formaldehid masuk ke dalam saluran pencernaan melalui makanan dan minuman. Akibat kecilnya ukuran berat molekul formaldehid maka menyebabkan formaldehid mudah diabsorpsi dan distribusi ke dalam sel tubuh. Gugus karbonil yang terkandung dalam formaldehid sangat aktif, sehingga mampu bereaksi dan merusak molekul biologis pada tubuh karena akan membentuk senyawa toksik yang mudah mengendap (Lu, 2009).

Formaldehid bersifat toksik akut karena metanol mudah menembus semua membran dan didistribusikan ke jaringan dan organ. Pada data yang dipublikasi oleh Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR) ditemukan bahwa manusia yang terpapar formaldehid secara oral dapat mengakibatkan cedera korosif pada traktus gastrointestinal, mucl, dan perforasi. Efek sistemik yang didapatkan antara lain asidosis metabolik, depresi sistem saraf pusat, koma, dan gagal ginjal. Formaldehid, setelah administrasi, secara cepat berdifusi ke banyak jaringan, termasuk ovarium (Karima, 2016).

Menurut penelitian Setyawati (2010), yang menggunakan dosis formalin bertingkat 140 mg/kgBB/hari, 210 mg/kgBB/hari, 280 mg/kgBB/ hari pada mencit untuk mengamati perkembangan fetus, didapatkan hasil pada dosis terendah 140 mg/kgBB/hari sudah menyebabkan bobot fetus berkurang dan ukurannya menjadi lebih pendek jika dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak diberi paparan formalin. Didukung dengan penelitian Anggraini (2017), formaldehid dengan dosis

140 mg/kgBB/hari pada mencit juga dapat mempengaruhi folikulogenesis dengan menunjukkan penurunan jumlah folikel dan peningkatan ekspresi caspase-3 pada mencit betina (*Mus musculus*), sehingga dalam penelitian ini dipilih dosis tersebut.

2.3.1 Metabolisme Formaldehid



Gambar 2. 3 Metabolisme formaldehid (Teng *et al.*, 2001)

Formaldehid pada keadaan fisiologis dapat dimetabolisme dalam sel menjadi methanol di cytosolic oleh enzim *alcohol dehydrogenase* (ADH₁) atau akan di metabolisme menjadi asam format oleh enzim *Aldehyde dehydrogenase 2* (ALDH₂) yang berada di mitokondria sel dan oleh enzim *Alcohol dehydrogenase 3* (ADH₃) yang berada di cytosolic melalui beberapa tahapan. *Alcohol dehydrogenase 3* (ADH₃) akan mengoksidasi formaldehid menjadi asam format melalui tiga tahapan. Tahap pertama, GSH/*glutathione* akan bereaksi dengan formaldehid untuk membentuk *S-hydroxymethylglutathione*. Tahap kedua, *S-hydroxymethylglutathione* akan menjadi substrat yang berikatan dengan ADH₃ dan akan menghasilkan produk berupa *S-formylglutathione*. Tahap ketiga, *S-formylglutathione* dihidrolisis oleh *S-formylglutathione hydrolase* sehingga menghasilkan asam format dan terjadi depleksi GSH (Klassen, 2001). Atau jika

formaldehid masuk ke bagian sel mitokondria maka tahapan metabolismenya yakni formaldehid sebagai substrat akan langsung berikatan dengan enzim *Aldehyde dehydrogenase 2* (ALDH₂) yang menghasilkan produk berupa asam format (Teng *et al.*, 2001).

Melalui reaksi pembentukan asam format ini, paparan formalin berlebihan terbukti dapat menyebabkan turunnya kadar GSH/*glutathione*. Penurunan kadar GSH dapat mengurangi kinerja enzim *Glutathion Peroksidase* (GPx) sebagai antioksidan endogen, karena GSH merupakan substrat dari enzim GPx. Sehingga penurunan kadar GSH peroksidase sebagai antioksidan endogen menyebabkan peningkatan terbentuknya ROS. Ketidakseimbangan antara ROS dan antioksidan di dalam tubuh disebut sebagai stres oksidatif (Kumar, 2013).

Pada sistem reproduksi, proses apoptosis berdampak pada fungsi dan perkembangan normal ovarium. Apoptosis ovarium terjadi pada tiga sel yaitu oosit, sel granulosa, dan sel luteal. Apoptosis pada sel granulosa dapat terjadi pada tahapan folikulogenesis meliputi folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, dan folikel tersier (Fadhilah, 2017).

2.4 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah suatu molekul atom, atau beberapa grup atom yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Radikal bebas bersifat tidak stabil, sangat reaktif dan dapat mengambil elektron dari molekul lain upayanya mendapatkan pasangan elektron. Molekul yang kehilangan elektron ini dapat bersifat reaktif, terutama asam lemak tidak jenuh yang kemudian ditransformasikan menjadi radikal bebas yang sangat reaktif. Dalam upaya memenuhi keganjilan

elektronnya, radikal bebas yang elektronnya tidak berpasangan secara cepat akan menarik elektron makromolekul biologis yang berada di sekitarnya seperti protein, asam nukleat dan DNA. Jika molekul yang teroksidasi dan terdegradasi tersebut merupakan bagian dari sel atau organel, maka dapat mengakibatkan kerusakan pada sel tersebut (Arnanda, 2019).

Radikal bebas berasal dari 2 sumber, yaitu (Sayuti, 2015) :

1. Secara endogen

Radikal bebas pada organisme aerobik berasal dari 1-5% kebocoran elektron, elektron ini bereaksi dengan oksigen membentuk anion superoksida, reduksi O_2^- menjadi superoksida pada fagositosis. Secara endogen sumber radikal bebas berasal dari proses metabolik yang normal dalam tubuh manusia.

2. Secara eksogen

Secara eksogen, sumber radikal bebas berasal dari berbagai sumber diantaranya polutan, radiasi, ozon, pestisida, asap rokok.

Radikal bebas dan senyawa ROS dalam tubuh dapat menyebabkan (Astuti, 2008):

1. Kerusakan DNA

Senyawa radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab kerusakan DNA dengan cara mengoksidasi DNA. Sel yang mengandung DNA rusak (DNA damage) tersebut bila membelah sebelum DNA tersebut diperbaiki, akan mengakibatkan perubahan genetic secara permanen, yang merupakan tahap awal terjadinya karsinogenesis.

2. Peroksidasi protein

Perubahan LDL (*Low Density Lipoprotein*) menjadi LDL teroksidasi yang diperantarai oleh radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan dinding arteri dan kerusakan bagian arteri lainnya yang menyebabkan aterosklerosis.

3. Proksidasi Lipid

Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada ikatan lemak tak jenuh dalam fosfolipid membran (lipid peroksidasi) yang merusak struktur membrane serta menyebabkan fungsi dari organel sel.

Dalam keadaan normal, radikal bebas yang diproduksi didalam tubuh akan dinetralisir oleh antioksidan yang ada di dalam tubuh. Bila kadar radikal bebas terlalu tinggi seperti saat melakukan aktivitas fisik berat, maka kemampuan dari antioksidan endogen tidak memadai untuk menetralsir radikal bebas dengan antioksidan yang disebut stres oksidatif. Stres oksidatif jangka panjang telah terbukti dapat menimbulkan berbagai penyakit degeneratif (Sugiyarto, 2000).

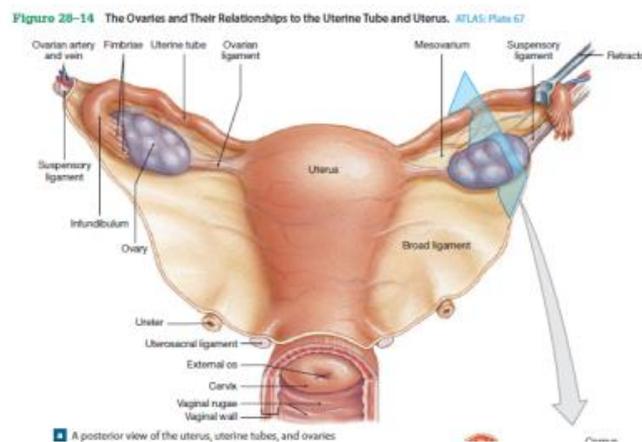
2.5 Ovarium

2.5.1 Anatomi dan Fisiologi Ovarium

Ovarium adalah sepasang organ berbentuk buah kenari yang mempunyai panjang sekitar 1,5 inchi atau 4 cm, lebar 1,5 cm, dan tebal 1 cm, terletak di kiri dan di kanan, dekat pada dinding pelvis di fossa ovarika. Ovarium melekat pada lapisan belakang ligamentum latum dengan mesovarium. Selain mesovarium, ovarium juga mempunyai dua perlekatan lain, ligamentum infundibulopelvikum (ligamentum suspensorium ovarii), yang merupakan tempat melintasnya pembuluh darah,

pembuluh limfe, dan persarafan ovarium dari dinding pelvis, dan ligamentum ovarii, yang menghubungkan ovarium dan uterus (Ellis, 2006).

Ovarium menerima aliran darah dari arteri ovarii yang merupakan percabangan dari aorta. Pada aliran darah balik, vena ovarii kanan menuju ke vena cava inferior, sedangkan vena ovarii kiri menuju ke vena renal. Pembuluh limfe ovarium melewati *aortic nodes* di level yang sama dengan pembuluh ginjal, mengikuti peraturan umum bahwa aliran pembuluh limfe suatu organ sama seperti aliran pembuluh vena organ tersebut. Untuk persarafan, ovarium menerima persarafan dari *aortic plexus* (T10) (Ellis, 2006).



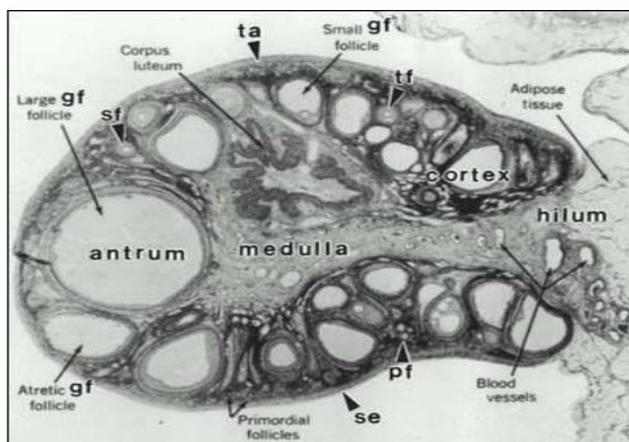
Gambar 2. 4 Anatomi ovarium (Martini, 2012).

Secara fisiologis ovarium akan melepaskan gamet (oosit) secara periodik dan menghasilkan hormon steroid, estradiol, dan progesterone Kedua aktivasi ini berintegrasi dalam proses berkesinambungan yang terus menerus dalam proses maturase folikel, kemudian ovulasi dan pembentukan korpus luteum dan regresi. Ovarium tidak bisa dianggap sebagai organ endokrin yang statis baik mengenai ukuran, fungsi dan bentuknya, sebagai respon terhadap rangsangan hormone tropic

yang kuat. Organ genitalia wanita akan mengalami perubahan jaringan sesuai siklus yang bisa diukur setiap minggu (Guyton, 2006).

2.5.2 Histogi Ovarium

Ovarium terbagi dalam 3 bagian yaitu korteks luar, medulla di sentral dan pintu ovarium (hilus) (Gambar 2.5) Hilus merupakan tempat perlekatan dengan mesovarium. Di hilus berisi pembuluh syaraf, pembuluh darah dan sel hillur yang menjadi aktif dalam proses steroidgenesis atau mampu tumor. Sel ini sangat mirip dengan sel leydig di testis yang memproduksi testostosterone. Bagian korteks yang paling luar disebut tunika albugenia, yang bagian atasnya ditutupi oleh satu lapis sel kuboid. Oosit berhubungan dengan kompleks yang disebut folikel. Bagian dalam korteks tertanam dekat dengan jaringan stroma (Campbell, 2008).

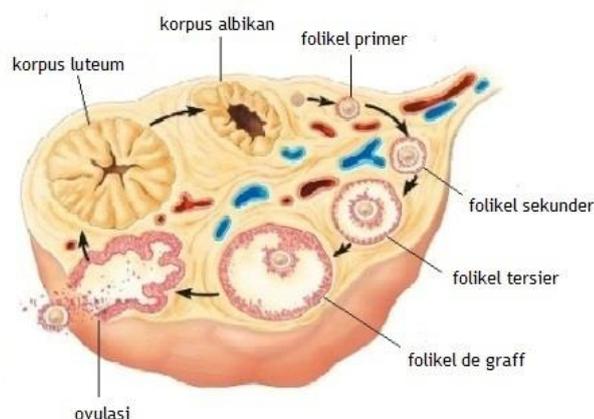


Gambar 2. 5 Histologi ovarium dapat dibagi menjadi 3 bagian: korteks, medulla dan hilus. Korteks terdiri dari epitelium permukaan (se), tunica albuginea (ta), folikel-folikel ovarium (primordial, primer (pf), sekunder (sf), folikel de Graff ukuran kecil, medium, besar (gf)) dan corpus luteum (cl). Medula terdiri dari pembuluh besar dan saraf. Hilus terdiri dari arteri spiralis besar dan hilus (Campbell, 2008).

2.5.3 Perkembangan Folikel (Folikulogenesis)

Folikel terdiri atas oosit atau telur yang dipadati/dilingkari sel granulosa dan sel teka pada tahap perkembangan, selanjutnya folikel menjalani beberapa

transisi perkembangan yang ireversibel, dan proses perkembangan folikel ini dikenal sebagai folikulogenesis ovarium. Ada beberapa tahap perkembangan folikel untuk mencapai kematangannya folikel harus melalui tingkatan-tingkatan perkembangan folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, dan folikel *de Graaf* (folikel matang) (Campbell, 2008)



Gambar 2. 6 Perkembangan folikel (folikulogenesis) (Sherwood, 2011)

1) Folikel Primordial

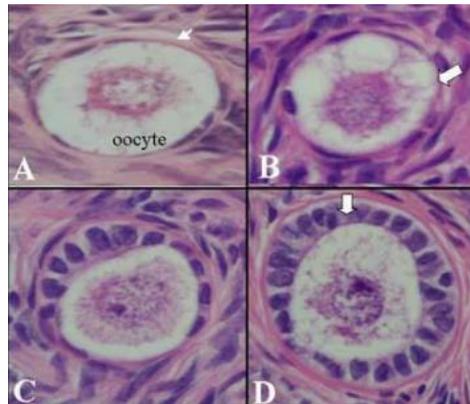
Folikel primordial merupakan folikel awal bawaan sejak sebelum lahir, pada tahap ini, folikel akan terus mengalami apoptosis kecuali ada rangsangan dari FSH, sejak sebelum lahir, folikel ini terus mengalami pengurangan jumlah yang sangat signifikan. Fetus pada minggu ke 5-6 kehamilan sudah memiliki folikel primordial, folikel-folikel tersebut bermigrasi ke kutub genital dan mengalami mitosis sehingga jumlahnya bertambah dengan sangat banyak dan mencapai puncaknya pada minggu ke 16-20 yang mencapai 6-7 juta folikel primordial. Seiring berjalannya waktu, folikel-folikel ini terus mengalami atresia secara fisiologis, sehingga pada saat persalinan jumlah folikel primordial menjadi 2 juta, bahkan saat

pubertas menurun hingga tersisa 300.000 folikel dan terus menurun jumlahnya seiring berjalannya waktu. Pengurangan folikel yang sangat banyak ini disebabkan karena folikel memiliki siklus hidup tersendiri yang terdiri atas 2 bagian yaitu (Sherwood, 2011):

- a. Gonadotropin responsive, terjadi pada rekrutmen folikel di awal, hal tersebut mengakibatkan folikel primordial ini akan tumbuh menjadi folikel primer kemudian sekunder, namun jika tidak ada FSH maka folikel tersebut akan mati.
- b. Gonadotropin dependent, merupakan kelanjutan dari siklus gonadotropin responsive, awal terjadi pada saat pubertas, karena hipofisis sudah mulai mengeluarkan FSH, maka FSH ini akan mempengaruhi folikel sekunder agar jumlah kematian folikel bisa atresia. dihambat, namun tetap ada folikel yang atresia (Anwar, 2005).

2) Folikel Primer

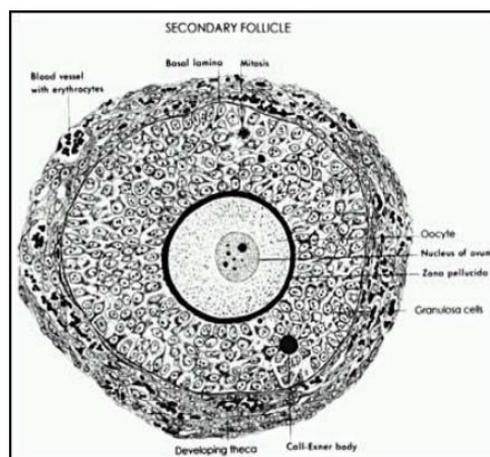
Pembentukan folikel primer ditandai oleh perubahan lapisan pregranulosa menjadi selapis sel granulosa yang berbentuk sel kuboid (Anwar, 2005).



Gambar 2. 7 Fotomikrograf stadium awal folikulogenesis preantral. A) Folikel Primordial. B) Transisi folikel primordial menjadi folikel primer. C) Folikel primer dengan sel granulosa multiple. D) Folikel primer sempurna (Gougeon, 2004)

3) Folikel preantral (sekunder)

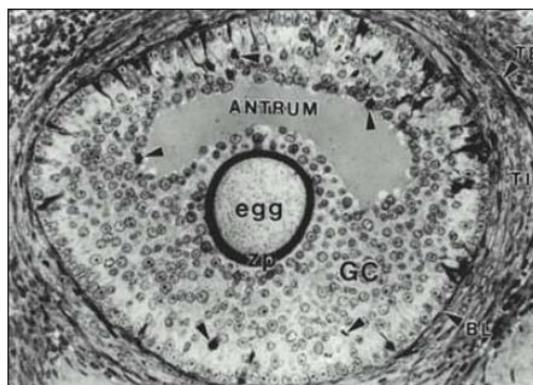
Pada saat memasuki fase gonadotropin dependent, dibawah pengaruh FSH, folikel akan mulai membesar, dan memiliki zona pelusida (membran yang membungkus folikel). Folikel yang mulai membesar ini diikuti oleh membesarnya sel granulosa penghasil esterogen. Bersama FSH, esterogen merangsang munculnya reseptor FSH di permukaan sel, sehingga sel menjadi semakin besar dan masuk ke fase folikel antral (Anwar, 2005).



Gambar 2. 8 Folikel sekunder (Gougeon, 2004)

4) Folikel Antral (tersier)

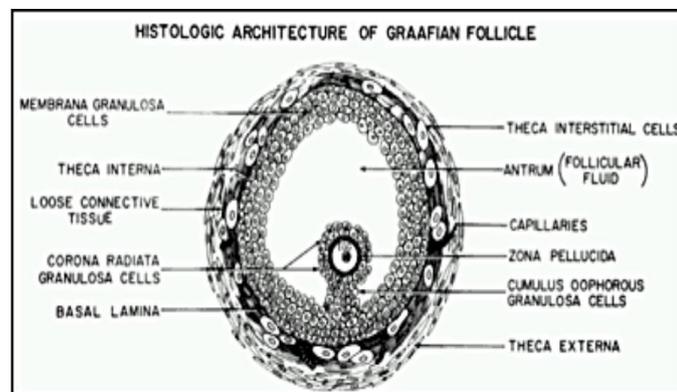
Folikel yang semakin membesar ini kemudian memproduksi lebih banyak cairan folikel yang kemudian berkumpul di tengah folikel. Adanya cairan ini yang kemudian menjadi ciri khas folikel antral. Cairan folikel ini berisi hormon, growth factor, dan sitokin yang berfungsi mematangkan oosit. (Anwar, 2005).



Gambar 2. 9 Fotomikrograf dari folikel tersier (Gougeon, 2004)

5) Folikel pre ovulatrik (*de Graaf*)

Folikel *de Graaf* merupakan folikel yang sudah matur dan siap untuk mengalami ovulasi, folikel ini merupakan folikel paling besar dengan kualitas terbaik (Anwar, 2005).



Gambar 2. 10 Folikel *de Graaf* (Gougeon, 2004)

2.5.4 Siklus Reproduksi Mencit

Siklus reproduksi mencit betina terdiri dari fase proestrus, estrus, metestrus dan diestrus dimana semua fase tersebut disebut siklus estrus. Sedangkan tipe siklus birahi pada mencit (*Mus musculus*) adalah poliestrus, dimana satu tahun dapat terjadi sebanyak dua kali masa birahi. Siklus hewan ini berulang secara periodik dengan selang waktu 4-5 hari (Isnaeni, 2006).

a. Fase Proestrus

Proestrus merupakan periode yang ditandai dengan tumbuhnya folikel oleh *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) yang akan menjadi folikel *de graaf*. Folikel yang tumbuh, akan menghasilkan cairan folikel dan estradiol yang lebih banyak. Sehingga pada fase ini terjadi pengembangan organ reproduksi seperti saluran tuba, uterus, dan vagina (Frandsen, 1992). Sistem reproduksi yang terbentuk akan melakukan persiapan-persiapan untuk melepaskan ovum yang membuat sekresi estrogen dalam darah semakin meningkat yang akan menimbulkan perubahan fisiologis saraf, yang disertai dengan kelakuan birahi pada mencit betina. Pada fase ini berlangsung selama 12 jam dan setiap folikelnya bertumbuh selama 1-2 hari sebelum fase estrus. Pemeriksaan swab vagina menunjukkan hasil epitel berinti dan sel darah putih berkurang dan digantikan oleh sel epitel bertanduk atau kornifikasi (Isnaeni, 2006).

b. Fase Estrus

Fase ini berlangsung selama 9-15 jam. Ditandai dengan keinginan birahi dan penerimaan pejantan oleh betina. Folikel *de graaf* membesar dan

matang. Tuba falopi menegang, epitel menjadi matang dan silia aktif serta terjadi kontraksi tuba falopii dan ujung tuba yang berfimbriae merapat ke folikel *de graaf*. Lendir serviks dan vagina bertambah serta terjadi banyak mitosis di dalam mukosa vagina dan sel-sel baru menumpuk, sementara lapisan permukaan menjadi squamosal bertanduk (kornifikasi). Sel-sel bertanduk tersebut terkelupas ke dalam vagina. LH menjadi lebih dominan pada fase ini untuk membantu terjadinya ovulasi (Isnaeni, 2006).

Estrus adalah fase birahi yang sangat penting. Dalam fase ini betina memperlihatkan gejala yang khusus untuk setiap hewan dan mulai menerima pejantan untuk kopulasi. Tanda kopulasi menjadi ciri khas pada fase ini. Ketika hewan betina menolak untuk kopulasi meskipun sudah memasuki fase estrus, maka hewan betina tersebut masih dalam tahap fase proestrus atau fase estrus sudah terlewat. Ciri lain yang khas pada fase ini adalah hilangnya nafsu makan, gelisah, menghampiri pejantan, dan lari jika pejantan mendekati dan menungganginya. Pada swab vagina menunjukkan banyak terdapat sel epitel yang berkornifikasi (Isnaeni, 2006).

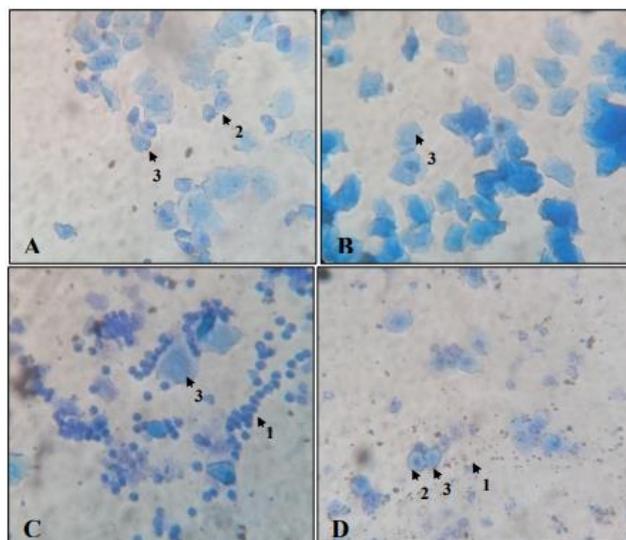
c. Fase Metestrus

Fase ini berlangsung selama 21 jam. Setelah folikel membesar dan pecah, terjadi pembentukan korpus luteum, sel telur yang dilepaskan akan menuju uterus. Kelenjar serviks akan mensekresi cairan yang kental dengan tujuan untuk menyumbat lumen serviks. Fase ini sebagian besar dipengaruhi oleh progesterone yang dihasilkan oleh korpus luteum. Progesterone menghambat sekresi FSH dan LH sehingga menghambat pembentukan

folikel dan mencegah terjadinya estrus. Selama siklus ini, uterus mempersiapkan diri untuk menerima dan memberi nutrisi embrio. Menjelang pertengahan sampai akhir siklus ini, uterus menjadi agak lunak karena pengendoran otot uterus. Pada pemeriksaan swab vagina menunjukkan hasil epitel berinti dan leukosit terlihat lagi dan jumlah sel kornifikasi berkurang (Isnaeni, 2006).

d. Fase Diestrus

Fase ini berlangsung selama 48 jam. Fase ini disebut juga dengan fase istirahat karena mencit betina sama sekali tidak tertarik pada mencit jantan. Fase ini merupakan fase terakhir dalam siklus birahi mencit. Fase ini ditandai dengan selaput lendir vagina yang tipis, perkembangan korpus luteum yang menghasilkan hormone progesterone. Endometrium lebih menebal dan kelenjar mengalami hipertrofi. Serviks menutup dan lendir vagina mulai kabur dan lengket. Selaput mukosa vagina pucat dan otot uterus mengendor. Pada akhir periode ini korpus luteum memperlihatkan perubahan- perubahan retrogresif dan vakualisasi secara gradual. Endometrium dan kelenjar beratrofi atau beregresi ke ukuran semula. Mulai terjadi perkembangan folikel-folikel primer dan sekunder dan akhirnya kembali ke proestrus. Pada pemeriksaan swab vagina yang terlihat hanya leukosit (Isnaeni, 2006).



Gambar 2. 11 Karakteristik fase reproduksi mencit pada pengamatan mikroskopis apus vagina dengan perbesaran 400x. (A) fase proestrus, (B) fase estrus, (C) fase metestrus, (D) fase diestrus. Keterangan gambar 1. Sel leukosit, 2. Sel epitel berinti, 3) Sel epitel terkornifikasi (Haryanto, 2019)

2.5.5 Siklus Hormon pada Mencit

Aktivitas sistem reproduksi sebagian besar dikontrol oleh hormon. Pengontrolan hormonal terhadap reproduksi merupakan suatu sistem pengawasan dan pengaturan kompleks serta sangat seimbang. Hormon-hormon reproduksi saling menstimulir atau menghambat untuk mencapai keseimbangan fungsi serta pengaruh terhadap organ-organ reproduksi. Hormon reproduksi berperan penting dalam inisiasi dan pengaturan siklus birahi, proses ovulasi sampai pada fertilisasi, mempersiapkan uterus untuk menangkap ovum yang telah dibuahi yang kemudian mempertahankan kehamilan hingga siap untuk dilahirkan (Sherwood, 2011).

Hipotalamus dan pusat kegiatan hormonal dan aktivitas reproduksi yang diatur oleh *gonadotropin releasing hormon* (GnRH). GnRH merangsang hipofisis anterior memproduksi FSH dan LH. FSH dan LH yang dihasilkan hipofisis anterior dan hormon progesteron dan estrogen mempengaruhi siklus estrus. Pada fase proestrus, FSH menyebabkan sel granulosa di dalam folikel akan cepat menjadi

banyak kemudian terbentuk ruangan dalam folikel. Folikel ini disebut dengan folikel sel-sel granulosa menghasilkan hormon estrogen. Hormon estrogen tertinggi terjadi pada fase proestrus dan menurun pada fase estrus dan terendah pada fase metestrus. Estrogen merangsang pertumbuhan epitel vagina dan folikel ovarium sehingga siap untuk ovulasi. Folikel matang akan memproduksi estrogen sampai kadar estrogen dalam darah menjadi tinggi yang menandakan fase estrus pada mencit. Kadar estrogen yang tinggi merangsang GnRH memproduksi LH. Lonjakan LH mengakibatkan ovulasi. Sisa folikel di ovarium berubah menjadi korpus luteum dan menghasilkan progesteron. Progesteron menyebabkan perubahan pada lapisan endometrium yang dipersiapkan untuk implantasi. Lapisan ini terbentuk pada fase metestrus. Saat fase diestrus, jika terjadi implantasi kadar progesteron penting dalam pertumbuhan plasenta. Apabila tidak terjadi implantasi kadar estrogen dan progesteron menurun dan menyebabkan terjadinya pengelupasan lapisan endometrium. Estrogen merupakan hormon seks steroid yang berfungsi untuk pertumbuhan dan perkembangan seksual betina seperti kelenjar mammae dan organ reproduksi yang lain. Estrogen memicu proliferasi sel. Estrogen membutuhkan reseptor untuk mencapai jaringan atau sel target yang dikendalikan oleh gen (Ganong, 2003).

2.6 Bahaya Formaldehid terhadap Folikel Ovarium

Formaldehid yang masuk ke dalam tubuh akan dimetabolisme dengan bantuan *glutathione* dan menghasilkan *hydroxymethylglutathion*. *Hydroxymethylglutathion* bersama NAD⁺ dan ADH₃ akan dikatalisasi enzim formaldehyde dehydrogenase menghasilkan *S-formylglutathione* selanjutnya

dengan bantuan enzim *S-formylglutathione* hidrolase akan menghasilkan asam format (Teng *et al.*, 2001). Paparan formaldehid yang terjadi secara terus-menerus menyebabkan terbentuknya produk asam format secara berlebihan. Paparan formaldehid yang berlebih akan mengakibatkan penurunan *glutathione* (GSH) sehingga asam format semakin menumpuk dan menyebabkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Kumar, 2013).

Akibatnya akan terjadi proses stres oksidatif yang dapat mempengaruhi hipotalamus dalam menstimulasi *gonadotropin releasing hormon* (GnRH) untuk mensekresi FSH. FSH memacu pertumbuhan dan kematangan folikel. FSH yang menurun dapat menghambat perkembangan folikel dalam ovarium dan atresia ovarium sehingga dapat mengakibatkan gangguan ovulasi.

Paparan formaldehid yang diberikan pada mencit dengan dosis 140mg/KGBB/hari secara oral selama 12 hari memberikan efek apoptosis pada sel granulosa ovarium (Fadhilah, 2017). Penelitian tentang pengaruh formaldehid terhadap sistem reproduksi pernah dilakukan oleh Guo-qing (2011). Penelitian terhadap tikus betina yang dipapar formalin dengan 0.2mg/Kg, 2.0mg/Kg dan 20 mg/Kg melalui injeksi peritoneal selama 14 hari menunjukkan kerusakan patologis jaringan ovarium, oosit dan sel granulosa yaitu menyebabkan atrofi ovarium, gangguan struktural fibrosis dan oosit serta sel granulosa menunjukkan penyusutan ultrastruktur membran mitokondria dan nukleus lebih kecil.

2.7 Metode Identifikasi Senyawa dalam Ekstrak

2.7.1 Metode Identifikasi dengan Uji Warna

Metode identifikasi dengan uji warna merupakan suatu prosedur kimia yang dilakukan dalam pengujian senyawa dengan cara menggunakan berbagai macam pereaksi warna. Tujuan dari dilakukan uji reaksi warna untuk mengamati adanya perubahan warna yang terjadi dari senyawa kimia secara keseluruhan. Sehingga, dapat diketahui secara jelas karakteristik dari senyawa-senyawa kimia tersebut (Hariana, 2008).

2.7.1.1 Identifikasi Flavonoid

Identifikasi ini dilakukan untuk memastikan bahwa dalam ekstrak yang telah dibuat benar-benar mengandung senyawa aktif flavonoid. Tahapan pengujiannya yakni sebanyak 2 ml ekstrak ditambahkan air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan sedikit serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat, kemudian dikocok. Hasil positif mengandung flavonoid jika terbentuk warna merah, kuning atau jingga (Iling, 2017).

2.7.1.2 Identifikasi Gugus Fenol

Uji Fitokimia menggunakan FeCl_3 dapat menunjukkan adanya gugus fenol, apabila terdapat senyawa fenol, maka dimungkinkan juga terdapat tanin, karena tanin merupakan senyawa polifenol. Perubahan warna adanya gugus fenol ditunjukkan dengan warna hijau kehitaman dan biru kehitaman setelah ditambahkan reagen FeCl_3 (Muthmainnah, 2017).

2.7.1.3 Identifikasi Tanin

Identifikasi tanin perlu dilakukan, karena senyawa marker otentik yang terdapat pada buah delima merah, ellagitanin termasuk golongan senyawa tanin. Tahap pertama, ditimbang 1 gram ekstrak dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dididihkan selama 5 menit dan filtrat diambil. Ditambahkan FeCl_3 1% sebanyak 3-4 tetes. Hasil positif mengandung tanin dengan ditunjukkan dengan warna hitam kebiruan atau hijau tua (Muthmainnah, 2017). Identifikasi tanin juga dapat dengan menambahkan larutan gelatin 1% ke dalam ekstrak buah delima yang telah diencerkan dengan aquades. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih (Desinta, 2015).

2.7.2 Metode Identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode kromatografi yang paling sederhana dengan menggunakan wadah yang tertutup berisi plat dengan pelarut yang telah ditotolkan sampel sehingga dapat dilakukan pemisahan baik secara kuantitatif maupun kualitatif. KLT merupakan metode kromatografi padat-cair yang terdiri dari fase diam berupa lapisan tipis, kering merata, terbuat dari bahan serbuk halus yang dilapiskan secara akurat pada suatu kaca, plastik, atau lempeng aluminium, serta fase gerak dapat berupa pelarut tunggal ataupun campuran (Rachman, 2017).

Prinsip dari metode kromatografi lapis tipis didasarkan terhadap distribusi senyawa antara fase tetap padat yang diterapkan pada gelas atau plat plastik dan fase gerak cair yang akan melewati fase padat tersebut. Adapun, sejumlah kecil senyawa atau campuran diterapkan pada titik awal tepat di atas bagian bawah dari

plat dan dikembangkan menggunakan chamber (bejana pengembang) berisi pelarut organik tertentu. Maka, fase gerak akan membawa senyawa yang paling larut menuju plat serta senyawa yang kurang larut dalam fase gerak akan tetap tertinggal disebabkan mempunyai afinitas cukup tinggi (Kumar *et al.*, 2013).

Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) telah menjadi bagian dari teknik analisis rutin pada laboratorium analisis karena memiliki beberapa keuntungan. Keuntungan utama metode analisis kromatografi lapis tipis dibandingkan dengan metode kromatografi yang lain adalah analisis beberapa sampel secara stimulant dengan menggunakan fase gerak dalam jumlah kecil sehingga lebih hemat waktu dan biaya analisis serta lebih ramah lingkungan. Teknik pemisahannya sederhana dengan peralatan yang minimal (Wulandari, 2011).

2.8 Metode Terhadap Sampel

2.8.1 Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa aktif dari tanaman menggunakan pelarut yang sesuai, selanjutnya senyawa aktif yang diekstrak akan larut dan terpisah dari bahan yang tidak larut dengan pelarut yang digunakan. Contoh senyawa aktif biasa diekstrak yakni alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, dan lain-lain. Sifat kelarutan dari senyawa aktif ini berbeda-beda tergantung pada struktur molekulnya (Sembiring, 2007).

Prinsip kerja dari ekstraksi adalah like dissolve like, jadi apabila senyawa yang akan diekstraksi bersifat non polar maka senyawa tersebut akan larut dalam pelarut non polar. Begitu juga sebaliknya apabila senyawa yang akan diekstraksi adalah senyawa polar maka senyawa tersebut akan larut dalam pelarut polar. Proses

ekstraksi menyebabkan terjadi banyak perubahan, baik secara fisika maupun secara kimia yang meliputi perubahan struktural terhadap bahan. Ekstraksi memiliki jenis metode yang bermacam-macam, pada metode ekstraksi secara dingin terdapat jenis ekstraksi yaitu maserasi, dan perlokasi, sedangkan pada metode ekstraksi secara panas terdapat jenis ekstraksi soxhletasi, refluks, digesti, infus, dan distilasi (Wonoraharjo, 2013). Untuk ekstraksi yang dilakukan pada penelitian kami yakni metode dingin jenis maserasi.

2.8.2 Metode Maserasi

Maserasi merupakan proses perendaman serbuk dari tanaman yang akan diekstraksi dengan menggunakan pelarut organik pada suhu ruangan. Ekstraksi secara maserasi menguntungkan karena mekanisme kerja utama yang dilakukan sederhana yakni melalui perendaman pada waktu yang telah ditentukan dengan bantuan pengadukan. Waktu yang cukup diberikan bagi pelarut untuk berdifusi melalui dinding sel dan melarutkan konstituen yang ada pada tumbuhan. Prosesnya hanya terjadi dengan difusi molekuler. Setelah waktu yang diinginkan, cairan disaring, residu padat ditekan untuk memperoleh pelarut sebanyak mungkin akan memecah dinding dan membran sel, sehingga senyawa metabolit dapat keluar (Khunaifi, 2010).

Mekanisme dari maserasi ini terdiri dari 3 tahapan. Tahap pertama, bagian tanaman yang akan diteliti diubah menjadi bentuk serbuk dengan cara digiling agar terjadi kontak yang baik antara pelarut dan bahan. Setelah penggilingan, pelarut yang dipilih ditambahkan dalam bejana tertutup. Kemudian, cairan disaring dan residu padat dari proses ekstraksi ini ditekan untuk bisa didapat sejumlah besar

larutan yang tersumbat. Selama proses maserasi sesekali dilakukan pengadukan untuk meningkatkan proses difusi dan menghilangkan larutan pekat dari permukaan sampel agar hasil ekstraksi yang lebih banyak (Mathoes *et al.*, 2014).

Pelarut yang digunakan adalah etanol. Alasan pemilihan pelarut tersebut didasarkan pada sebagian besar senyawa yang terkandung dalam buah delima merah bersifat polar, sehingga penggunaan etanol sebagai pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang tinggi sudah sesuai. Pelarut etanol terdiri dari beberapa variasi konsentrasi seperti etanol 70%, etanol 95%, etanol 96%. Dalam penelitian ini digunakan pelarut etanol 70% dengan alasan bersifat lebih polar, menyesuaikan dengan senyawa yang akan diekstrak yang bersifat polar. Dengan alasan ini diharapkan persen rendemen yang didapatkan akan semakin tinggi (Noviyanti, 2016).

2.9 Hewan Coba Mencit (*Mus musculus*)



Gambar 2. 12 Mencit (*Mus musculus*) (Priambodo, 1995)

Klasifikasi dari mencit (*Mus musculus*) adalah sebagai berikut (Priambodo, 1995):

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia

Famili : Muridae

Genus : Mus

Spesies : *Mus musculus*

Mencit banyak digunakan sebagai hewan laboratorium (khususnya digunakan dalam penelitian biologi), penggunaan mencit pada penelitian ini karena mencit memiliki keunggulan-keunggulan salah satunya, sifat produksi dan karakteristik reproduksinya manusia (Fauziah, 2013). Mencit memiliki kemampuan reproduksi tinggi (sekitar 10-12 anak/kelahiran), harga dan biaya pemeliharaan relatif murah, serta efisien dalam waktu karena sifat genetik dapat dibuat seragam dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan ternak besar (Kartika, 2013).

Mencit adalah hewan yang lebih sering melakukan aktivitasnya pada malam hari sehingga disebut sebagai hewan nokturnal. Perilaku hewan ini dipengaruhi oleh dua faktor yaitu faktor internal meliputi hormon, seks, kehamilan, perbedaan umur, penyakit dan faktor eksternal meliputi lingkungan sekitar, makanan dan minuman. Mencit memiliki bagian tubuh yang terdiri dari kepala, leher, badan dan ekor. Mencit memiliki rambut yang berwarna putih atau keabuan dengan rambut yang tumbuh di bagian perut berwarna lebih pucat. Mencit dapat bertahan hidup selama 1 – 3 tahun dan sudah bisa dikawinkan pada umur 8 minggu ketika mencit betina mengalami estrus selama 4 – 5 hari kemudian mencit akan bunting selama 19 – 21 hari. Panjang mencit jantan dan betina sekitar 12 – 20 cm. Berat badan mencit jantan berkisar antara 20 – 40 gram, sementara betina memiliki berat antara 25 – 40 gram (Rejeki *et al.*, 2018).

Serupa dengan mamalia lainnya, organ pernafasan pada mencit juga mempunyai paru – paru untuk sistem respirasi dengan satu lobus pada paru – paru kiri dan empat lobus pada paru – paru kanan. Ketika suhu dingin mencit memiliki kemampuan untuk memproduksi panas atau biasa disebut dengan *brown fat* yang

dijumpai di aksila, sepanjang *vena jugularis*, dekat *hilus* ginjal dan uretra. Organ pencernaan pada mencit terdiri atas esofagus, lambung, duodenum, jejunum, ileum, sekum, kolon dan rektum. Sistem ekskresi pada mencit juga memiliki fungsi yang sama dengan mamalia lainnya yaitu untuk mengeluarkan komponen sisa dari hasil metabolisme dalam tubuh. Ketika proses ekskresi berlangsung terdapat beberapa bagian tubuh yang berperan penting antara lain paru-paru, kulit, hati dan ginjal. Cara membedakan antara mencit betina dengan mencit jantan bisa dilihat dari adanya kantung skrotum pada mencit jantan yang berisi testis serta ada jarak diantara anus dengan genitalia eksterna yang lebih jauh jika dibandingkan dengan mencit betina (Rejeki *et al*, 2018).

Pemilihan mencit sebagai hewan coba di laboratorium adalah sekitar 40-80%, mencit banyak dipilih sebagai hewan coba karena siklus hidupnya relatif pendek, variasi sifat-sifatnya yang tinggi, jumlah anak per kelahiran banyak, mudah ditangani, serta sifat anatomi dan fisiologinya memiliki karakteristik dengan baik (Tolistiawaty *et al*, 2014).

Setiap perlakuan yang diberikan pada hewan coba khususnya mencit perlu diperhatikan, dimulai dari cara memegang mencit harus dengan benar, pada bagian ujung ekor menggunakan tangan kanan, perlakuan yang diberikan akan merubah kondisi mencit menjadi stres, hal tersebut ditandai dengan mencit yang akan mencengkram bagian kandang kemudian tubuh mencit akan bergetar dan rambut mencit yang akan membuka atau mekar, maka mencit harus dijinakkan dengan cara dielus bagian tengkuk mencit menggunakan jari. Jika mencit sudah jinak, maka tangan kiri tepatnya bagian ibu jari dan telunjuk bertugas menjepit bagian tengkuk

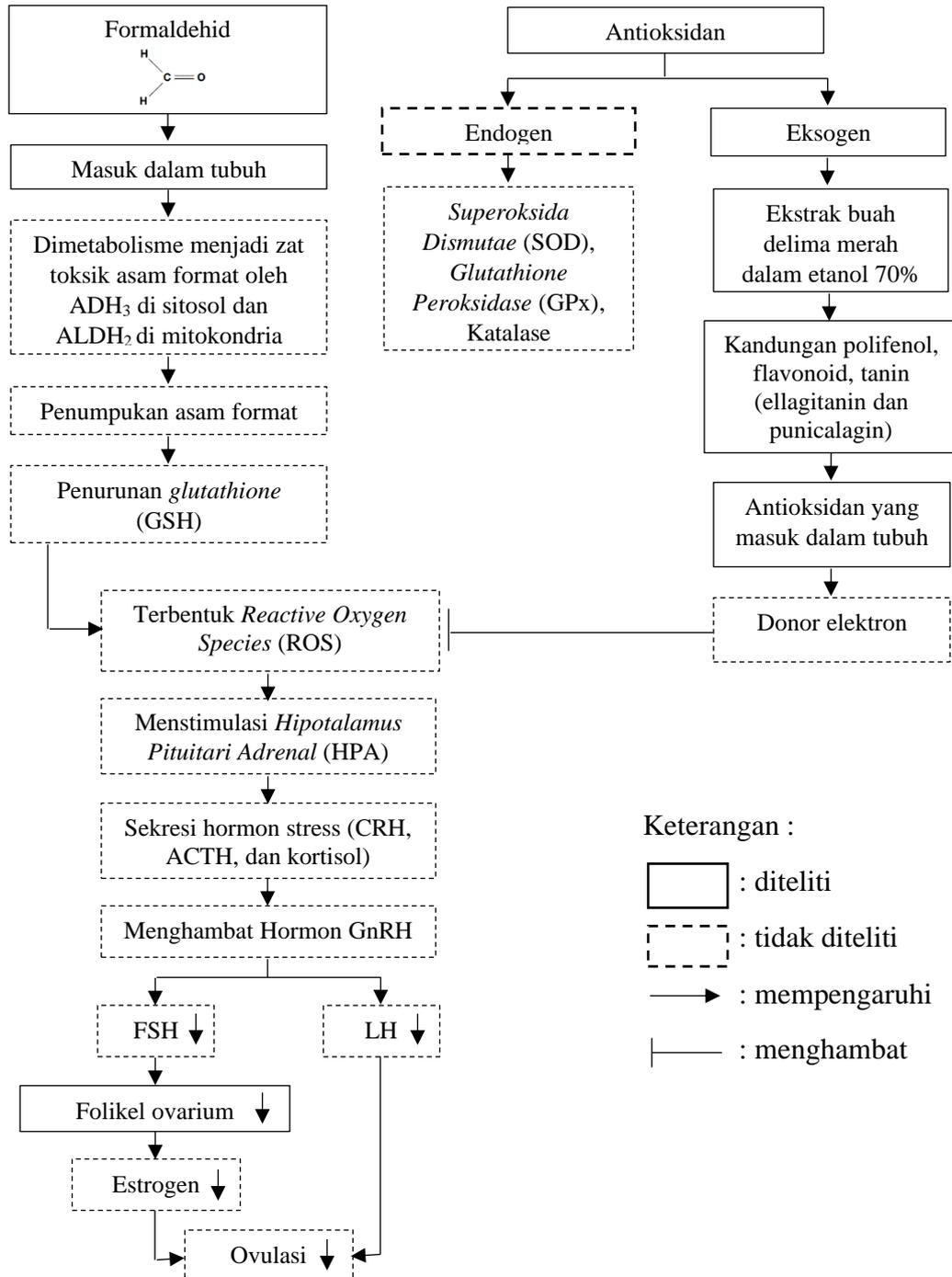
dengn kerat lalu ekor mencit diarahkan ke antara jari kelingking dengan jari manis pada tangan kiri kemudian dijepit. Hingga akhirnya posisi mencit dalam keadaan terlentang di tangan kiri dan siap menerima perlakuan selanjutnya (Malole, 1989).

Berbagai macam rute pemberian sediaan berupa obat maupun ekstrak yang dapat diterapkan untuk mencit, salah satunya adalah rute per oral. Pemberian secara oral pada mencit harus dilakukan dengan alat bantuan yaitu berupa spuit yang telah dilengkapi oleh kanula oral yang memiliki ujung tumpul sehingga tidak melukai mencit, alat tersebut biasa dikenal dengan sebutan sonde. Sonde berfungsi untuk memastikan agar semua sediaan yang diberikan diterima oleh mencit sehingga tidak ada sediaan yang terbuang (Lailani *et al*, 2013). Sediaan yang diberikan ke mencit dapat dipastikan tidak terbuang hal ini karena sonde berperan sebagai alat yang dimasukkan kedalam mulut, setelah itu perlahan masuk ke arah langit-langit bagian belakang sampai esofagus hingga masuk menuju ke lambung. Pada saat memasukkan sonde kedalam mulut hingga esofagus perlu berhati – hati, dikarenakan jika cara yang dilakukan salah maka akan menyebabkan suatu sediaan yang masuk akan tidak tepat yaitu justru ke saluran pernafasan sehingga mengakibatkan gangguan pernafasan pada mencit bahkan kematian (Thompson, 1985).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3. 1 Kerangka Konsep

3.2 Uraian Kerangka Konsep

Penggunaan formaldehid pada pengawet makanan dapat merusak organ tubuh. Setelah tertelan dan masuk ke dalam tubuh, formalin akan di metabolisme menjadi asam format oleh *Aldehyde dehydrogenase 2* (ALDH₂) yang berada di mitokondria sel dan oleh *Alcohol dehydrogenase 3* (ADH₃) yang berada di sitosol. Melalui tahapan metabolisme ini, Pembentukan asam format ini secara langsung mengurangi jumlah antioksidan alami dalam tubuh berupa *glutathione* (GSH). Penurunan antioksidan *glutathione* (GSH) sebagai antioksidan alami menyebabkan peningkatan terbentuknya radikal bebas. Paparan formaldehid yang terjadi secara terus-menerus menyebabkan terbentuknya produk asam format secara berlebihan. Paparan formaldehid yang berlebih akan mengakibatkan penurunan *glutathione* (GSH) sehingga asam format semakin menumpuk dan menyebabkan *Reactive Oxygen Species* (ROS).

Akibatnya kadar ROS meningkat menyebabkan molekul reaktif meningkat juga. Sehingga terjadi proses stres oksidatif yang menstimulasi hipotalamus untuk mengeluarkan hormon stress (CRH, ACTH, dan kortisol). Hormon stress menghambat *gonadotropin releasing hormon* (GnRH) untuk mensekresi FSH. FSH memacu pertumbuhan dan kematangan folikel. FSH yang menurun dapat menghambat perkembangan folikel ovarium sehingga dapat mengakibatkan gangguan ovulasi.

Di dalam tubuh terdapat antioksidan endogen yaitu SOD, GPx, GSH yang bekerja secara sinergis untuk menghambat terjadinya radikal bebas. Namun jika radikal bebas sudah terlalu tinggi, maka antioksidan endogen tidak akan mampu

menetralsir, sehingga diperlukan antioksidan luar. Antioksidan alami yang berasal dari luar yaitu delima merah digunakan dalam penelitian ini sebagai antioksidan untuk menghambat radikal bebas.

Buah delima merah dikenal dengan aktivitas antioksidan kuat yang mampu mencegah atau mengobati berbagai kerusakan akibat stres oksidatif sehingga mampu melindungi kerusakan organ melalui mekanisme antioksidan (Harling, 2019). Pada buah delima merah memiliki kandungan antioksidan tinggi yakni 92% dari total antioksidan karena bagian ini kaya akan kandungan polifenol yang terdiri dari flavonoid (antosianin, katekin, dan flavonoid kompleks lainnya) dan tanin terhidrolis (punicallagin, pedunculagin, punicalagin, ellagic acid) (Aviram *et al.*, 2008). Selain itu, pada kulit delima merah mengandung 20-30% ellagitanin dan telah diteliti sebagai antioksidan yang kuat (Siahaan *et al.*, 2017).

3.3 Hipotesis

H_0 = Pemberian ekstrak buah delima merah tidak berpengaruh terhadap jumlah folikel ovarium yang telah dipapar formaldehid

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan eksperimen sungguhan (*True Experimental*). Eksperimen sungguhan (*True Experimental*) merupakan jenis penelitian yang meneliti antara kelompok yang diberi perlakuan (kelompok eksperimen) dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan (kelompok kontrol) kemudian membandingkan antara keduanya (Siyoto dan Sodik, 2015). Sedangkan, rancangan penelitian ini menggunakan *Post Test Only Control Grup Design* dimana dilakukan dengan cara dipilih secara random atau acak dan kemudian dilakukan *post test* atau satu kali penilaian. Adanya kelompok eksperimen dan kelompok kontrol yang dipilih secara random atau acak merupakan syarat utama dari penelitian sungguhan (*True Experimental*) (Margono, 2010).

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2021 – Maret 2021. Tempat pelaksanaan penelitian yaitu:

1. Laboratorium Biomedik dan Farmakokinetik, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Laboratorium Fitokimia, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Laboratorium Botani Farmasi, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

4. Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang.
5. Unit Pelaksana Teknis Balai Materia Medika Kota Batu, Jawa Timur.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian adalah keseluruhan objek yang diteliti sehingga mampu memberikan data (informasi) penelitian secara keseluruhan (Siyoto dan Sodik, 2015). Populasi yang digunakan dalam penelitian ini berupa mencit (*Mus Musculus*) galur Balb/c dengan kelamin betina. Penggunaan hewan mencit dipilih karena memiliki kemampuan reproduksi tinggi (sekitar 10-12 anak/kelahiran), harga dan biaya pemeliharaan relatif murah, serta efisien dalam waktu karena sifat genetik dapat dibuat seragam dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan ternak besar (Kartika, 2013).

4.3.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian adalah sebagian kecil dari anggota populasi yang diambil menggunakan prosedur tertentu, sehingga mampu mewakili populasinya (Siyoto dan Sodik, 2015). Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini harus memenuhi syarat dan kriteria yang telah ditentukan. Kriteria dari mencit betina dalam penelitian tersebut yaitu:

A. Kriteria Inklusi

1. Mencit galur Balb/c berjenis kelamin betina
2. Usia sekitar 3-4 bulan
3. Berat badan sekitar 20-30 gram

4. Keadaan sehat yang ditandai dengan bergerak aktif
5. Tidak ada kecacatan secara anatomi
6. Mencit pernah bunting dan melahirkan

B. Kriteria Eksklusi

1. Mencit yang mati saat masa pemberian perlakuan

4.3.3 Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah sampel dalam penelitian dapat ditentukan berdasarkan perhitungan rumus $[(t-1)(n-1) \geq 15]$ dimana t adalah jumlah perlakuan yang akan diberikan dan n adalah jumlah sampel per kelompok yang hendak dicari (Federer, 1991).

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Keterangan:

n : jumlah objek penelitian untuk setiap perlakuan

t : jumlah perlakuan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka jumlah sampel hewan coba pada setiap kelompok perlakuan adalah 5 ekor. Total kelompok yang digunakan pada penelitian adalah 5 sehingga diperoleh jumlah keseluruhan 25 ekor.

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

Penelitian eksperimental mengandung tiga variabel utama yaitu variabel variabel bebas (independent), terikat (dependent), dan variabel kontrol. Variabel

bebas adalah bagian dari eksperimen yang menyebabkan terjadinya perubahan pada variabel terikat, termasuk perlakuan dan keadaan variabel seperti usia, ukuran, berat, dll. Sedangkan variabel terikat adalah variabel yang menerima perlakuan/mengalami perubahan akibat variabel bebas. Hasilnya akan diukur untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang telah diberikan. Kemudian diperlukan variabel kontrol untuk mengetahui atau mengendalikan variabel pengganggu.

1. Variabel bebas : Ekstrak buah delima merah (*Punica granatum L.*), formaldehid, vitamin C
2. Variabel terikat : Jumlah folikel ovarium.
3. Variabel kontrol : Kandang, pakan, minuman.

4.4.2 Definisi Operasional Variabel

Tabel 4. 1 Definisi operasional

No	Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
1.	Variabel Bebas	Ekstrak buah delima merah (<i>Punica granatum L.</i>)	Ekstrak buah delima merah (<i>Punica granatum L.</i>) diperoleh dari Surabaya Flora Gallery dengan ekstraksi metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan ekstrak dilarutkan dengan CMC Na 0,1%. Ekstrak dibuat 3 dosis bertingkat 18,2 mg/20gBB; 36,4 mg/20gBB; 72,8 mg/20gBB dan diberikan per oral pada mencit betina Balb/c dalam kelompok perlakuan 1,2,3 selama 14 hari	Rasio
		Formaldehid	Larutan formaldehid diberikan pada semua kelompok perlakuan (5 kelompok). Pemberian larutan formaldehid 10% per oral selama 14 hari dengan dosis 2,8 mg/20 grBB mencit	Rasio
		Vitamin C	Vitamin C diberikan pada 1 kelompok perlakuan. Pemberian	Rasio

			dilakukan dengan cara vitamin C dilarutkan dengan aquadest dan diberikan per oral menggunakan sonde dengan dosis 1,3 mg/20 grBB mencit.	
2.	Variabel Terikat	Jumlah folikel ovarium a. Jumlah folikel primer b. Jumlah folikel sekunder c. Jumlah folikel tersier d. Jumlah folikel <i>de Graaf</i>	<p>a. Folikel terdiri atas oosit primer yang dikelilingi oleh selapis epitel pipih yang disebut sel folikuler dan berkumpul di bawah tunika albugenia</p> <p>b. Folikel terdiri atas epitel banyak lapis dari sel-sel granulosa berbentuk polyhedral dan mengitari oosit serta ditandai dengan perkembangan zona pelusida yang mengitari membran plasma</p> <p>c. Folikel ditandai dengan pembentukan antrum folikuli. Antrum dibatasi oleh membran granulosa dan diisi oleh cairan folikel</p> <p>d. Folikel yang hampir mengalami ovulasi. Oosit berada pada salah satu sisi dikelilingi oleh cumulus oophorus</p> <p>Folikel diamati dengan menghitung jumlah folikelnya pada preparat histologi yang dibuat menggunakan perwarna Haematoxylin Eosin dan diamati dengan mikroskop Olympus perbesaran 100x dengan 4 lapang pandang. Perhitungan dilakukan secara manual menggunakan aplikasi <i>Image Raster</i>.</p>	Rasio
3.	Variabel Kontrol	Kandang	Kandang berupa bak plastik berukuran 40 x 30 x 18 cm digunakan untuk 6 mencit dengan penutup kandang berupa kawat. Kandang diberi alas berupa serbuk gergaji sebagai	Rasio

			penghangat bagi mencit (<i>Mus musculus</i>)	
		Pakan	Pemberian pakan yang sesuai yang pakan mencit BR1 dilakukan satu kali sehari pada pagi hari	Rasio
		Minuman	Minuman diberikan secara <i>ad libitum</i> (diberikan secara tidak terbatas). Botol minum dibersihkan tiap tiga hari sekali dan diisi ulang dengan air yang baru apabila air telah habis. Air minum yang digunakan yaitu air mineral bermerek Club.	Rasio

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat-Alat Penelitian

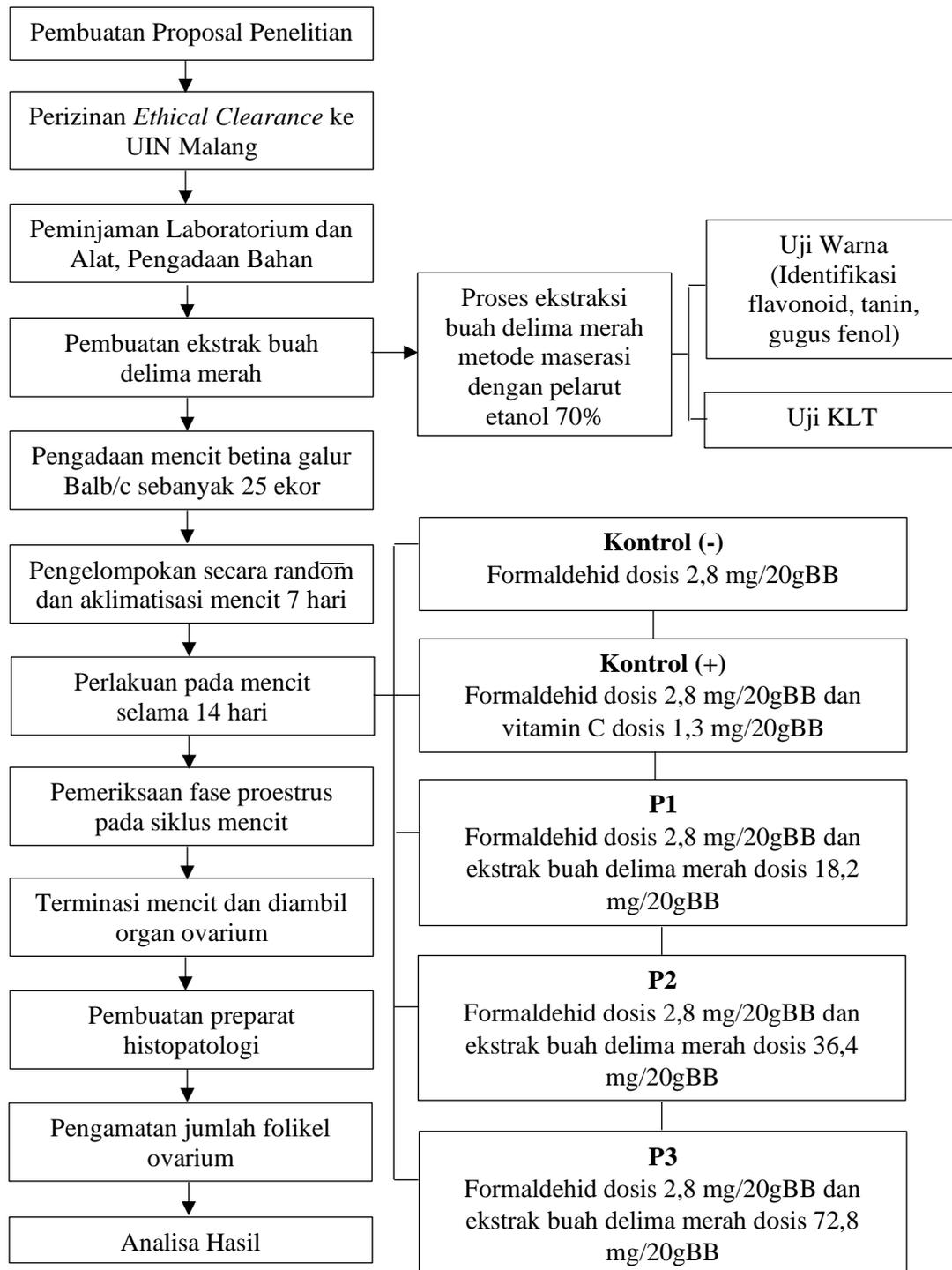
Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini meliputi kandang pemeliharaan mencit, tempat makan plastik, botol air minum, masker, sarung tangan, sonde oral, *beaker glass*, batang pengaduk, pipet volume, pipet ukur, corong kaca, *push ball*, neraca analitik, chamber (bejana pengembang), spatula, kertas label, kaki tiga, bunsen, kasa, kaca arloji, spuit 3cc, pisau bedah, pinset, jarum pentul, gunting bedah, botot kaca, sonde mencit, lampu ultraviolet, kaca preparat, mikroskop, *rotary evaporator* merek heidolph instrument, oven, aluminium foil, kertas saring.

4.5.2 Bahan-Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini meliputi mencit betina galur Balb/c dengan umur 3-4 bulan, buah delima merah, sekam, makanan serta minuman mencit, etanol 70%, larutan formaldehid 10%, Vitamin C, larutan KCl pekat, reagen FeCl₃, larutan gelatin, reagen vanillin, butanol, kloroform, etil asetat, plat KLT F₂₅₄, aquades, reagen NaNO₂, CMC Na, serbuk magnesium, HCl pekat.

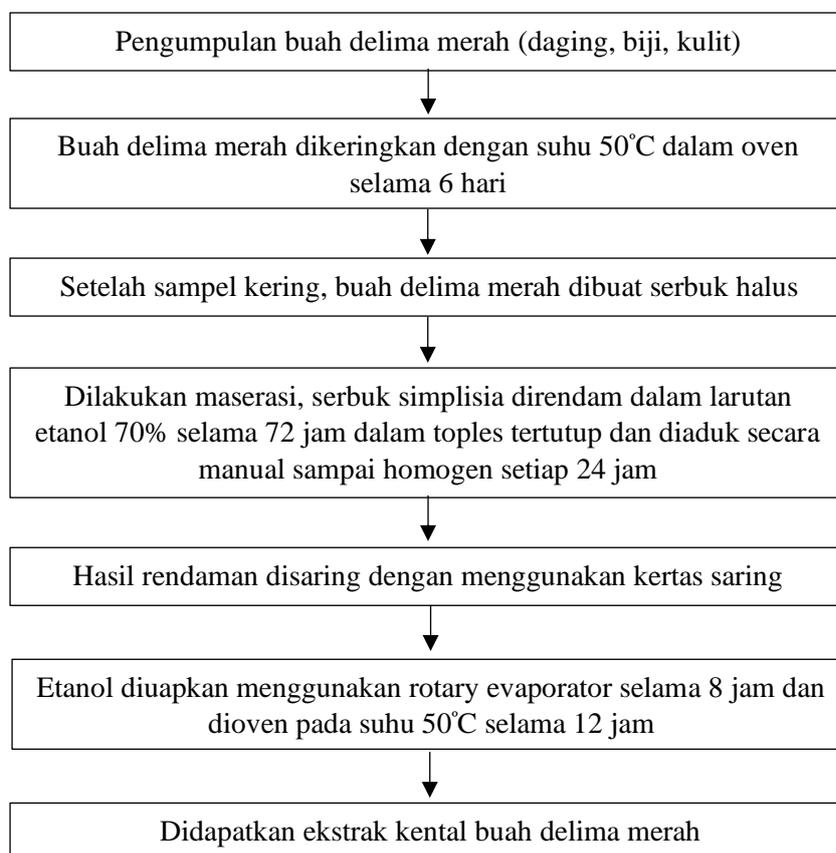
4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Alur Penelitian



4.6.2 Proses Tanaman

4.6.2.1 Ekstraksi

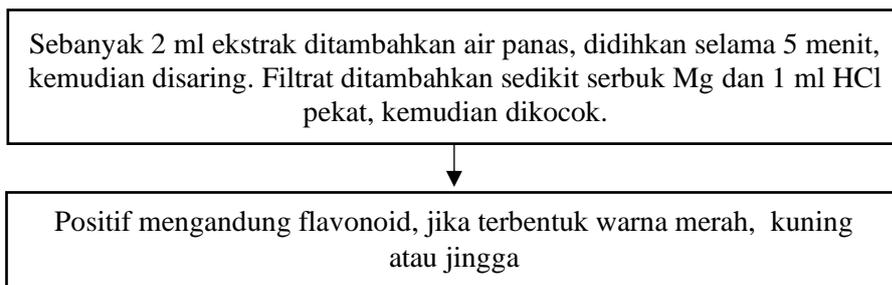


Tahapan maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia buah delima merah sebanyak 500 gram dengan pelarut etanol 70% selama 3x24 jam pada ruangan bersuhu kamar dalam toples tertutup dan terlindung dari cahaya, sambil dilakukan pengadukan secara manual setiap 24 jam, agar mempercepat proses pelarutan senyawa kimia dalam simplisia. Perbandingan pelarut yang digunakan yakni 1:3, jadi total pelarut etanol 70% yang digunakan 1500 ml. Hasil rendemen disaring dengan menggunakan kertas saring. Kemudian pelarut etanol diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* selama 6 jam dan dioven pada suhu 50°C selama 12 jam. Hasil akhir didapatkan sediaan ekstrak buah delima merah yang

berwarna hitam kecoklatan. Ekstrak disimpan dalam wadah tertutup dengan suhu 2°C sampai pemakaian.

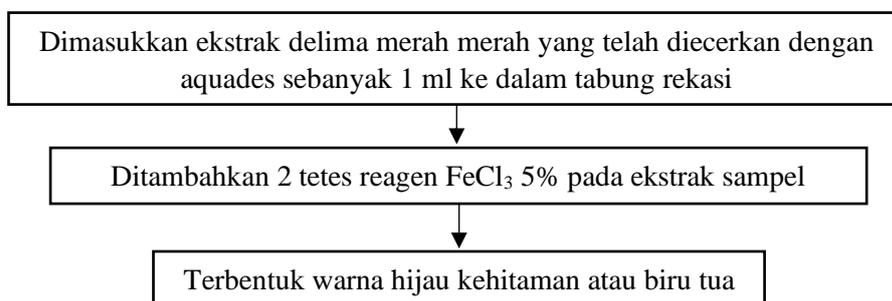
4.6.2.2 Pengujian

4.6.2.2.1 Identifikasi Flavonoid



Identifikasi ini dilakukan untuk memastikan bahwa dalam ekstrak yang telah dibuat benar-benar mengandung senyawa aktif flavonoid. Tahapan pengujiannya yakni sebanyak 2 ml ekstrak ditambahkan air panas, didihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan sedikit serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat, kemudian dikocok. Hasil positif mengandung flavonoid jika terbentuk warna merah, kuning atau jingga.

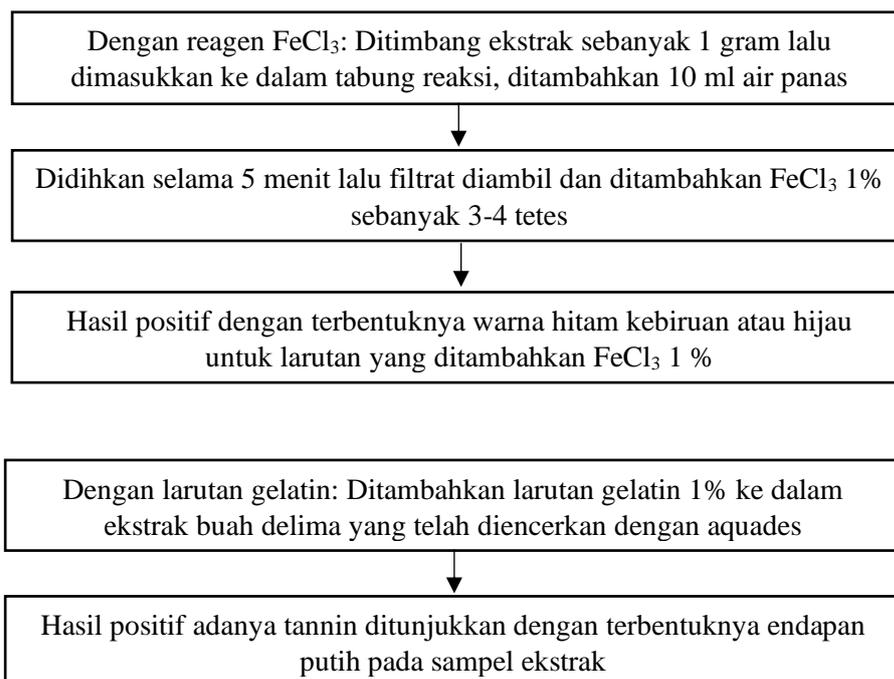
4.6.2.2.2 Identifikasi Gugus Fenol



Identifikasi ini dilakukan untuk memastikan bahwa senyawa fenol benar-benar terdapat pada ekstrak buah delima merah yang dibuat. Tahapan pengujiannya yakni dimasukkan ekstrak delima merah yang telah diecerkan 1 ml dengan aquadest

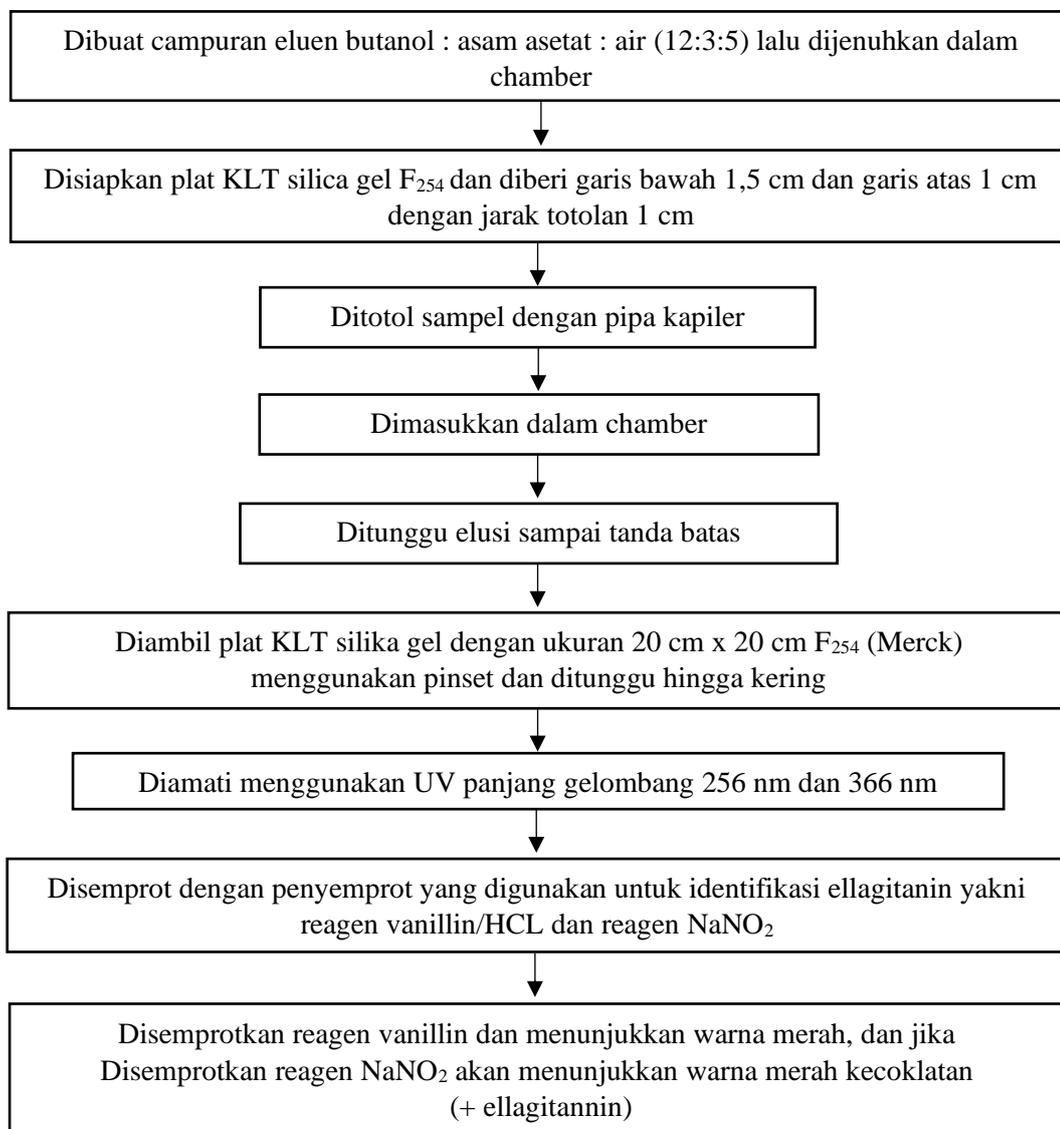
ke dalam tabung rekasi. Lalu, ditambahkan 2 tetes reagen FeCl_3 5% pada ekstrak sampel dan hasil positif menunjukkan terbentuknya warna hijau atau hijau kehitaman pada ekstrak.

4.6.2.2.3 Identifikasi Tanin



Identifikasi tanin perlu dilakukan, karena senyawa marker otentik yang terdapat pada buah delima merah, ellagitanin termasuk golongan senyawa tanin. Tahap pertama, ditimbang 1 gram ekstrak dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu didihkan selama 5 menit dan filtrate diambil. Ditambahkan FeCl_3 1% sebanyak 3-4 tetes. Hasil positif mengandung tanin dengan ditunjukkan dengan warna hitam kebiruan atau hijau tua (Muthmainnah, 2017). Identifikasi tanin juga dapat dengan menambahkan larutan gelatin 1% ke dalam ekstrak buah delima yang telah diencerkan dengan aquades. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih (Desinta, 2015).

4.6.2.2.4 Uji Kromatografi Lapis Tipis



Untuk memperkuat alasan bahwa senyawa ellagitanin terdapat pada ekstrak buah delima merah (*Punica granatum* L) maka dilakukan pengujian menggunakan reagen vanillin/HCl dan reagen NaNO₂. Pembuatan reagen vanillin/HCl dibuat dengan melarutkan 1 gram vanillin ke dalam 10 ml HCl 12 M. Setelah dibuat, hendaknya reagen ini langsung digunakan karena sifatnya yang tidak dapat bertahan lama. Sedangkan reagen NaNO₂ dibuat dengan melarutkan 20 mg NaNO₂

dan beberapa tetes asam asetat pekat (glacial) dalam 10 ml aquades yang telah didinginkan. Menurut (Hernawan dan Ahmad, 2003) prosedur pengujian ini bisa digunakan untuk deteksi ellagitanin dengan menggunakan prosedur kromatografi kertas atau kromatografi lapis tipis, tahapan pengujiannya yakni

4.6.3 Proses Hewan Coba

4.6.3.1 Persiapan

Hewan coba diadaptasikan terlebih dahulu dalam lingkungan kandang di Laboratorium Hewan Coba Jurusan Farmasi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang selama satu minggu dan diletakkan di dalam kandang tiap kelompok yang berjumlah 5 ekor sebanyak 5 kandang atau kelompok dengan diberi makan dan minum setiap hari.

4.6.3.2 Kelompok Perlakuan

Mencit sebanyak 25 ekor dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan kontrol masing-masing berjumlah 5 ekor, kelompok perlakuan dibagi sebagai berikut:

1. (K-) : Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB menggunakan sonde selama 14 hari
2. (K+) : Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan vitamin C dosis 1,3 mg/25gBB menggunakan sonde selama 14 hari.
3. (P1) : Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 18,2 mg/20gbb menggunakan sonde selama 14 hari.
4. (P2) : Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 36,4 mg/20gbb menggunakan sonde selama 14 hari.

5. (P3) : Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 72,8 mg/20gBB menggunakan sonde selama 14 hari.

4.6.3.3 Pemeriksaan Fase pada Siklus Mencit

Pemeriksaan siklus mencit menggunakan metode apus vagina sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rintafiani (2014). Langkah pertama yang dilakukan adalah pengapusan vagina mencit (*Mus musculus*) menggunakan *cotton buds* yang telah dibasahi larutan NaCl 0,9 % sedalam \pm 5 mm dengan diputar searah jarum jam sebanyak 2 – 3 kali putaran. Kemudian *cotton buds* tersebut dioleskan tipis dan searah di atas gelas obyek yang telah dibersihkan untuk membuat preparat apusan vagina. Kemudian preparat difiksasi dengan alkohol 70 % selama 5 menit. Selanjutnya ditetaskan pewarna giemsa 1 % pada preparat dan dibiarkan selama 5 – 10 menit hingga pewarna agak kering. Preparat dibilas menggunakan aquades dan dikeringkan. Sisa air maupun pewarna yang berlebihan dibersihkan menggunakan tissue. Preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali untuk mengamati sel epitel yang masih berinti atau telah mengalami kornifikasi sehingga diketahui fase yang dialami mencit (*Mus musculus*).

4.6.3.4 Tahap Pembedahan Mencit

Mencit di anestesi terlebih dahulu dengan menggunakan zat penganestesi hewan berupa kloroform, kemudian mencit diletakkan diatas papan fiksasi untuk dibedah dan diambil organ ovarium. Organ ovarium lalu dicuci terlebih dahulu menggunakan NaCl 0,9% dan dimasukkan ke dalam vial yang berisi formalin 10% minimal 7 jam sebelum proses pembuatan preparat agar awet dan tidak terjadi

kerusakan. Selanjutnya, dilakukan proses pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) dan pembuatan preparat.

4.6.3.5 Tahap Pengamatan dan Perhitungan Sampel

Folikel diamati dengan menghitung jumlah folikelnya pada preparat histologi yang dibuat menggunakan perwarna Haematoxylin Eosin dan diamati dengan mikroskop Olympus perbesaran 100x dengan 4 lapang pandang. Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung secara manual menggunakan aplikasi *Image Raster*.

$$\sum \text{folikel ovarium} = n_1 + n_2 + \dots + n_x$$

Keterangan:

n = Jumlah folikel yang diamati pada lapang pandang
x = Jumlah lapang pandang yang diamati

4.7 Analisis Data dan Pengolahan Data

4.7.1. Uji Normalitas Data

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui dan memastikan bahwa data hasil pengamatan yang didapatkan terdistribusi secara normal atau tidak. Jenis uji normalitas yang digunakan dalam penelitian ini adalah Shapiro Wilk dengan menggunakan bantuan alat SPSS. Alasan menggunakan uji Shapiro Wilk dalam penentuan uji normalitas data dikarenakan sampel yang digunakan dalam penelitian ini kurang dari 50 ekor. Hasil dari uji normalitas data dikatakan terdistribusi normal apabila nilai signifikansi lebih besar dari nilai p yaitu 0,05 begitu juga sebaliknya apabila nilai p signifikansi lebih kecil dari nilai α yaitu (0,05) maka tidak bisa dikatakan terdistribusi normal (Dahlan, 2014).

4.7.2 Uji Homogenitas Data

Uji homogenitas dilakukan untuk menguji kehomogenan (sejenis) atau tidaknya variabel perlakuan yang digunakan dalam penelitian. Analisa data dalam penelitian ini menggunakan Levene's Test. Data atau sampel yang didapatkan dikatakan homogen apabila uji Levene's Test telah memenuhi persyaratan homogenitas yakni menunjukkan nilai signifikansi sebesar ($>0,05$), dan apabila hasil yang didapat $<0,05$ maka data atau sampel yang telah didapat dikatakan belum memenuhi persyaratan (Dahlan, 2014).

Dalam uji statistik, apabila data terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji parametrik *One Way* ANOVA sedangkan data yang tidak terdistribusi normal dan tidak homogen akan diuji menggunakan uji non parametrik. Uji statistik non-parametrik bisa dilakukan dengan uji Kruskal Wallis. Uji Kruskal Wallis adalah uji yang digunakan untuk membandingkan dua atau lebih kelompok data sampel. H_0 dalam uji Kruskal Wallis adalah bahwa sampel berasal dari populasi yang sama. Dikatakan terdapat perbedaan yang signifikan jika signifikansi nilai kritis $< 0,05$ (H_0 ditolak). Hasil akhir uji Kruskal Wallis berupa nilai $p > 0,05$ dengan asumsi menerima H_1 dan menolak H_0 (Tyastitin dan Irul, 2017).

4.7.3 Uji *One Way* ANOVA (Analytical of Variance)

Uji *One Way* ANOVA merupakan teknik statistika parametrik yang digunakan untuk membandingkan nilai rata-rata yang berasal dari masing-masing kelompok perlakuan dengan cara mengetahui minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan. Apabila terdapat perbedaan signifikan, maka akan dilakukan analisa BNT (Beda Nyata Terkecil) yang dikenal sebagai LSD (*Least Significance*

Different) (Rojihah *et al.*, 2015). Syarat uji *One Way ANOVA* memiliki ketentuan berupa jika probabilitas lebih besar daripada taraf signifikansi ($p > 0,05$) menjadikan H_0 diterima, sedangkan jika probabilitas lebih kecil daripada taraf signifikansi ($p \leq 0,05$) menjadikan H_0 ditolak (Adi dan Masruri, 2017). Uji *One Way ANOVA* merupakan uji statistik yang dilakukan untuk mengetahui perbedaan rata-rata sampel yang lebih dari 2 kelompok yang kemudian akan dibandingkan. Uji *One Way ANOVA* merupakan bagian dari uji parametrik yang memiliki dugaan bahwa data berdistribusi normal dan pada masing-masing kelompok memiliki varian yang sama (homogen). Apabila terdapat perbedaan signifikan, maka akan dilakukan analisa BNT (Beda Nyata Terkecil) yang dikenal sebagai LSD (*Least Significance Different*). Kesimpulan dibuat berdasarkan nilai p , hipotesis dikatakan diterima bila nilai $p > 0,05$ berarti sama atau tidak memiliki beda signifikansi, namun ditolak jika bila nilai $p \leq 0,05$ berarti memiliki perbedaan yang signifikan (Dahlan, 2014).

4.7.4 Uji LSD (Least Significant Difference)

Uji LSD merupakan analisis lanjutan dari analisis varian bila H_0 pada analisis varian ditolak. Uji LSD dilakukan untuk mengetahui kelompok perlakuan yang berbeda signifikan terhadap kelompok perlakuan lainnya. Sehingga, jika $p \leq 0,05$ berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan tersebut (Dahlan, 2014).

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Determinasi Tanaman

Buah delima merah (*Punica granatum* L.) diperoleh dari kebun Surabaya Flora Gallery buah delima yang berasal dari Surabaya, Jawa Timur. Buah delima merah yang didapat kemudian dilakukan determinasi di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Herbal Materia Medica Batu Malang dengan nomor surat 074 / 601 A / 102.7 / 2020. Determinasi dari suatu tanaman bertujuan untuk memastikan keaslian identitas tanaman yang diteliti sehingga kesalahan dalam pemilihan tanaman atau pengumpulan bahan yang akan diteliti dapat dihindari (Megawati, 2019). Kunci determinasi dari simplisia buah delima merah adalah sebagai berikut: 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-16a-239b-243b-244b-248b-249b-250a-251b-253b-254b-255b-256b-261a-262b-263b-264a-1. Berdasarkan hasil determinasi tersebut, berikut adalah tingkatan taksonomi dari tanaman delima :

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)

Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)

Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)

Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)

Kelas : Dicotyledonae

Bangsa : Myrtales

Suku : Punicaceae

Marga : Punicae

Jenis : *Punica granatum* L.

Morfologi dari buah delima berupa dinding luarnya liat keras atau kaku, hampir seperti kayu, dinding dalam tipis, liat, bersekat-sekat, masing-masing ruang

dengan banyak biji, selaput biji tebal berair dan dapat dimakan, berwarna merah. Berdasarkan hasil determinasi tersebut, maka dapat diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah spesies *Punica granatum* L.

5.2 Pembuatan Ekstrak Buah Delima

5.2.1 Penyiapan Simplisia

Bahan baku simplisia yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari kebun Surabaya Flora Gallery. Buah delima merah yang dipilih adalah buah matang dalam keadaan baik dan tidak cacat. Tahapan ekstraksi dimulai dari proses penyortiran simplisia untuk menghilangkan kotoran atau benda asing pada simplisia. Sebanyak 3 kg buah delima merah dicuci dengan air mengalir sampai bersih kemudian ditiriskan untuk menghilangkan air dari sisa pencucian pada buah delima merah. Selanjutnya dilakukan perajangan pada buah delima merah menggunakan pisau *stainless steel* yang bertujuan agar proses pengeringan yang akan dilakukan berlangsung lebih cepat. Perajangan dilakukan dengan ketebalan \pm 3 mm (Ningsih, 2016). Apabila terlalu tebal maka proses pengeringan akan terlalu lama dan kemungkinan dapat membusuk atau berjamur. Perajangan yang terlalu tipis akan berakibat rusaknya kandungan kimia karena oksidasi atau reduksi. Alat perajang atau pisau yang digunakan sebaiknya bukan dari besi (misalnya *stainless steel* atau baja nirkarat) (Ditjen POM, 1990).

Buah delima merah (*Punica granatum* L.) yang telah dirajang kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C. Pengeringan yang tepat akan menghasilkan mutu simplisia yang tahan disimpan lama dan tidak terjadi perubahan. Menurut persyaratan obat tradisional pengeringan dilakukan sampai

kadar air tidak lebih dari 10%. Cara penetapan kadar air dilakukan menurut yang tertera dalam *Materia Medika Indonesia*. Pengeringan sebaiknya rajangan di bawah sinar matahari langsung, melainkan dengan almari pengering yang dilengkapi dengan kipas penyedot udara sehingga terjadi sirkulasi yang baik. Bila terpaksa dilakukan pengeringan di bawah sinar matahari maka perlu ditutup dengan kain hitam untuk menghindari terurainya kandungan kimia dan debu. Agar proses pengeringan berlangsung lebih singkat bahan harus dibuat rata dan tidak bertumpuk.

Setelah dilakukan pengeringan, dilanjutkan dengan sortasi kering. *Simplisia* buah delima merah yang telah dikeringkan kemudian dihaluskan melalui proses grinding untuk mendapatkan partikel yang jauh lebih kecil sehingga pelarut lebih mudah kontak dengan bahan dan berdifusi lebih banyak ke dalam partikel sehingga proses ekstraksi berlangsung lebih baik. Partikel sampel yang halus akan memperluas daya pelarutan sehingga pelarutan komponen pada sampel dapat lebih merata. Serbuk buah delima merah yang dihasilkan sebanyak 800 gram yang kemudian akan diekstraksi menggunakan metode maserasi.

5.2.2 Pembuatan Ekstrak

Serbuk *simplisia* buah delima merah diekstraksi menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman serbuk dari tanaman yang akan diekstraksi dengan menggunakan pelarut organik pada suhu ruangan (Khunaifi, 2010). Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%. Pelarut etanol dipilih karena berdasarkan pada sebagian besar senyawa yang terkandung dalam buah delima merah bersifat polar, sehingga penggunaan etanol sebagai pelarut yang memiliki

tingkat kepolaran yang tinggi sudah sesuai. Dalam penelitian ini digunakan pelarut etanol 70% dengan alasan bersifat lebih polar, menyesuaikan dengan senyawa yang akan diekstrak yang bersifat polar. Dengan alasan ini diharapkan persen rendemen yang didapatkan akan semakin tinggi (Noviyanti, 2016).

Proses ekstraksi dimulai dengan merendam serbuk buah delima merah sebanyak 500 gram ke dalam pelarut etanol 70% sebanyak 1500 ml dengan menggunakan perbandingan 1:3. Perendaman dilakukan selama 3 x 24 jam dengan pengadukan setiap 24 jam sekali. Kemudian endapan dan filtrat dipisahkan dengan menggunakan kertas saring. Maserat kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan kecepatan 70 rpm dengan tekanan 175 Psi. Fungsi dari evaporasi adalah untuk mengilangkan pelarut etanol 70% dalam ekstrak. Suhu yang digunakan pada proses evaporasi yaitu 40°C karena kandungan senyawa fenol pada buah delima merah akan rusak apabila dievaporasi diatas suhu 40°C. Untuk mendapat ekstrak kental dilakukan penguapan kembali menggunakan oven, sehingga diperoleh ekstrak kental buah delima merah berwarna coklat kehitaman.



Gambar 5. 1 Ekstrak kental delima merah (*Punica granatum* L.)

Kemudian preparasi sampel ini dilakukan perhitungan hasil rendemen yang diperoleh. Apabila rendemen yang dihasilkan semakin tinggi maka artinya senyawa bioaktif yang terkandung juga semakin banyak (Prabowo *et al.*, 2014). Perhitungan rendemen hasil dari perbandingan antara berat ekstrak dengan berat simplisia serbuk menggunakan satuan persen (%). Hasil rendemen yang diperoleh dari proses ekstraksi maserasi buah delima merah (*Punica granatum* L) yaitu sebanyak 22,95%.

Tabel 5. 1 Hasil rendemen ekstrak kental delima merah (*Punica granatum* L.)

Berat Simplisia Serbuk	Berat Ekstrak Kental	Perhitungan Rendemen	(%) Rendemen
500 gram	114,76 gram	$\frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$	22,95%

5.3 Uji Warna dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

5.3.1 Uji Warna

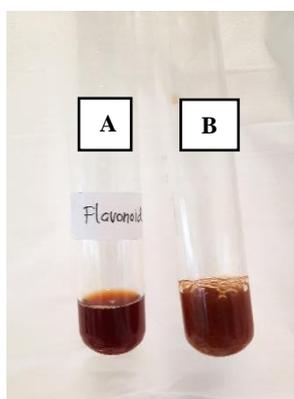
Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa fitokimia pada ekstrak etanol buah delima merah. Identifikasi senyawa dalam tanaman secara kualitatif dapat dilakukan dengan uji warna. Pengujian dilakukan dengan menggunakan suatu pereaksi. Pereaksi tersebut akan memberikan reaksi warna sehingga dapat mengetahui kandungan dalam tanaman.

Berdasarkan uji warna yang telah dilakukan pada ekstrak delima merah (*Punica granatum* L) positif mengandung senyawa flavonoid, fenol dan tanin.

5.3.1.1 Uji Senyawa Flavonoid

Uji senyawa flavonoid dilakukan dengan cara 2 ml ekstrak ditambahkan air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan sedikit serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat, kemudian dikocok. Magnesium dan asam klorida

pada uji wilstater bereaksi membentuk gelembung-gelembung yang merupakan gas H_2 , berfungsi untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terbentuk warna menjadi merah, kuning atau jingga (Illing, 2017). Hasil dari uji ini adalah terbentuk larutan berwarna merah yang menandakan ekstrak buah delima mengandung senyawa flavonoid (Illing, 2017). Hasil dari uji ini adalah terbentuk larutan berwarna merah yang menandakan ekstrak buah delima mengandung senyawa flavonoid.



Gambar 5. 2 Hasil positif uji flavonoid

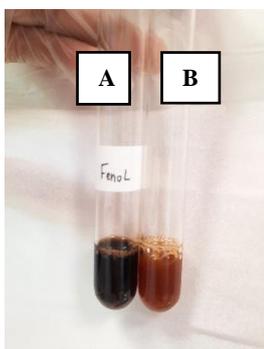
Keterangan :

A : Hasil uji flavonoid

B : Larutan ekstrak buah delima merah

5.3.1.2 Uji Senyawa Gugus Fenol

Hasil uji warna yang kedua yakni positif mengandung senyawa fenol, hal ini dibuktikan dengan adanya perubahan warna menjadi hijau kehitaman. Pereaksi yang digunakan berupa $FeCl_3$ dengan konsentrasi 5%. Prinsip reaksi yang terjadi yakni senyawa fenol mempunyai suatu gugus hidroksil yang nantinya akan bereaksi dengan ion Fe^{3+} yang terkandung dalam reagen $FeCl_3$ yang digunakan, sehingga menimbulkan terjadinya pembentukan senyawa kompleks berwarna hijau kehitaman (Muthmainnah, 2017).



Gambar 5. 3 Hasil positif uji fenol

Keterangan :

A : Hasil uji fenol

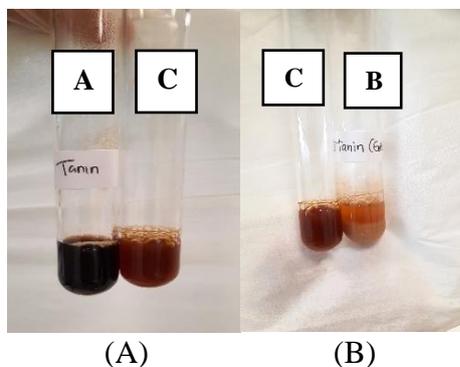
B : Larutan ekstrak buah delima merah

5.3.1.3 Uji Senyawa Tanin

Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui ekstrak mengandung senyawa aktif tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan meninmbang ekstrak buah delima sebanyak 1 gram ke dalam 10 ml air panas dan didihkan selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan dengan FeCl_3 1% sebanyak 3-4 tetes Hasil positif mengandung tannin apabila terbentuk warna hitam kebiruan (Muthmainnah, 2017). Pada uji ini, didapatkan hasil positif pada sampel yaitu terbentuk warna hitam kebiruan.

Uji tanin yang kedua dilakukan dengan menambahkan larutan gelatin 1% ke dalam ekstrak buah delima merah yang telah diencerkan dengan aquades. Pada uji gelatin terbentuk endapan putih yang menunjukkan bahwa tanin yang terdapat pada ekstrak buah delima merah menggumpalkan protein dari gelatin dengan membentuk kopolimer yang tidak larut dalam air sehingga terbentuk endapan (Desinta, 2015). Pada uji ini, didapatkan hasil positif yaitu terbentuk endapan putih

pada sampel. Berdasarkan hasil uji dengan larutan FeCl_3 dan uji gelatin dapat diketahui bahwa ekstrak buah delima merah positif mengandung senyawa tanin.



Gambar 5. 4 (A) Hasil positif uji tanin FeCl_3 (B) Hasil positif uji tanin gelatin

Keterangan :

A : Hasil uji tanin (terbentuk warna hitam kebiruan pada uji FeCl_3)

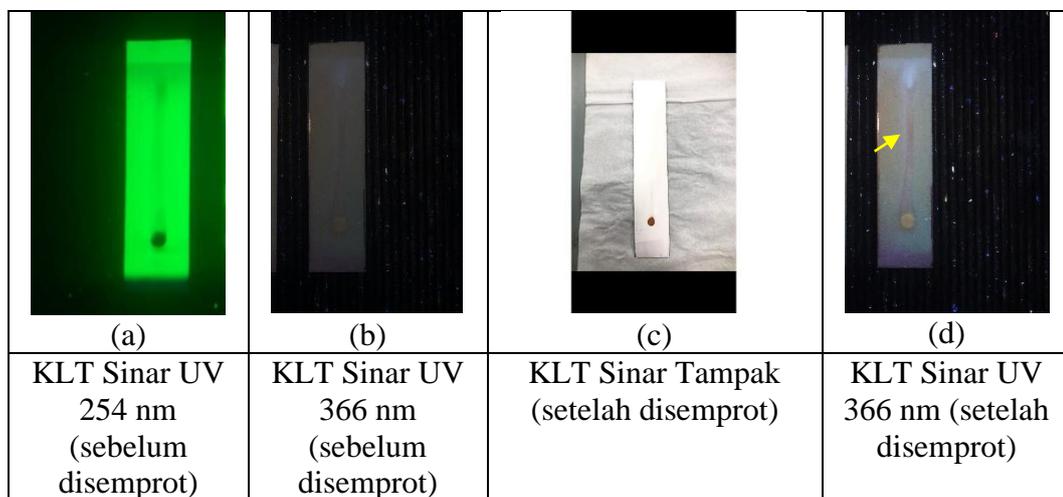
B : Hasil uji tanin (terbentuk endapan berwarna putih pada uji gelatin)

C : Larutan ekstrak buah delima merah

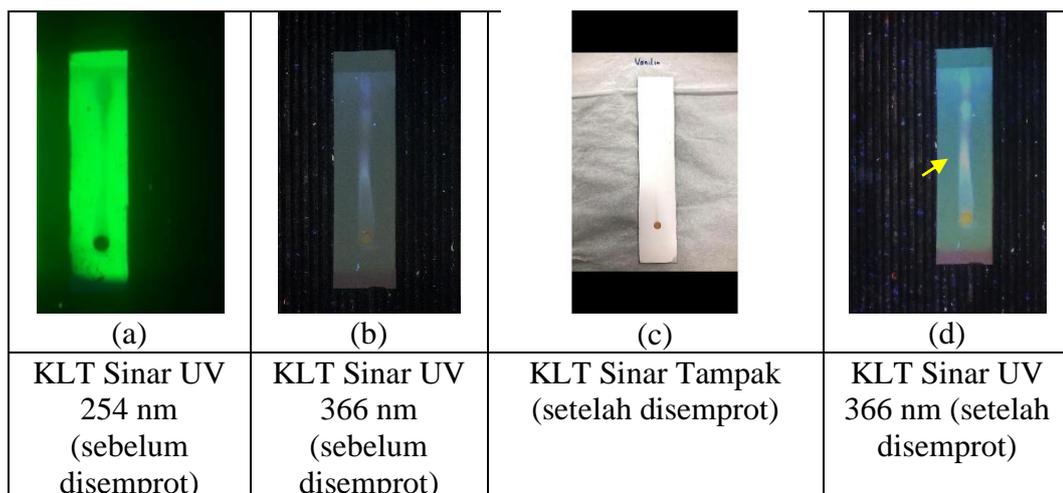
5.3.2 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji KLT yang dilakukan menggunakan fase stasioner jenis silika gel (plat silika gel F_{254}). Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu campuran butanol: asam asetat: air (12:3:5). Sedangkan reagen penyemprot yang digunakan berupa NaNO_2 10% dengan reagen vanillin/HCl. Ekstrak delima merah (*Punica granatum* L) ditotolkan pada plat KLT dengan bantuan pipa kapiler. Kemudian setelah penotolan dilakukan, selanjutnya plat didiamkan sejenak hingga kering. Setelah plat kering dimasukkan ke dalam chamber yang sudah berisi campuran fase gerak cair. Selanjutnya, proses elusi atau fase gerak sudah mencapai batas plat yang ditentukan, lalu plat diangkat dan dikeringkan. Kemudian diamati dengan bantuan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya disemprotkan dengan reagen NaNO_2 dan vanillin/HCl, lalu dipanaskan dengan menggunakan TLC Plate Heater CAMAG pada suhu 105°C . Dilakukan

pengamatan lagi pada sinar UV setelah penyemprotan dan pemanasan. Kedua reagen tersebut mampu mengidentifikasi adanya senyawa ellagitanin, dimana hasilnya positif mengandung senyawa tersebut dengan adanya perubahan reaksi warna yang khas berupa merah kecoklatan jika disemprot dengan reagen NaNO_2 dan jika disemprotkan reagen vanillin/HCl memunculkan warna merah. Hasil Uji KLT dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 5. 5 Hasil KLT ekstrak etanol 70% buah delima merah (NaNO_2 : warna merah kecoklatan)

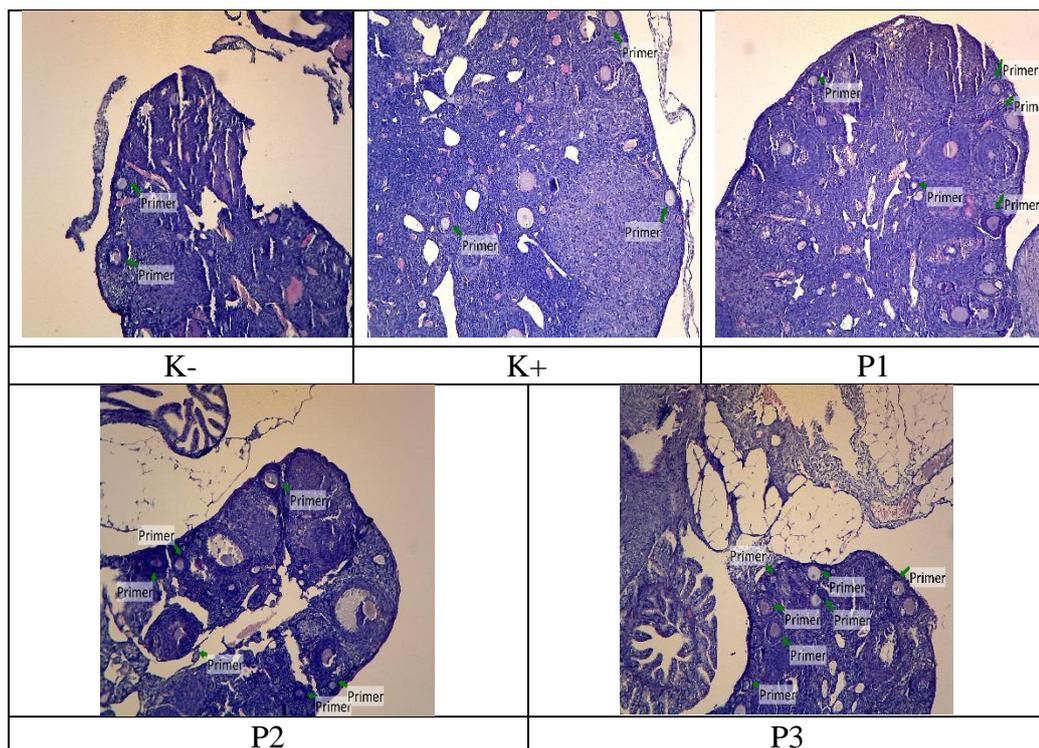


Gambar 5. 6 Hasil KLT ekstrak etanol 70% buah delima merah (Vanillin: warna merah)

5.4 Hasil Analisis Data Jumlah Folikel Ovarium

5.4.1 Hasil Analisis Data Jumlah Folikel Primer

Hasil pengaruh dari ekstrak buah delima merah pada jumlah folikel primer ovarium diamati dari hasil preparat histologi ovarium mencit yang telah dilakukan pewarnaan dengan *hematoksilin-eosin*. Pengamatan histologi menggunakan mikroskop cahaya merek Olympus dengan perbesaran 100 kali. Hasil pengamatan berupa gambar diamati dengan *Software Image Raster 3.0*. Pengamatan dilakukan dari 4 lapang pandang yang berbeda. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui jumlah folikel primer ovarium pada tiap kelompok perlakuan secara mikroskopis.



Gambar 5. 7 Histologi folikel primer ovarium terlihat dengan menggunakan pewarnaan HE pada K-, K+, P1, P2, P3 dengan perbesaran 100x ditunjukkan oleh tanda panah hijau

Hasil dari perhitungan jumlah folikel primer dari masing-masing sampel sebagai berikut:

Tabel 5. 2 Hasil perhitungan jumlah folikel primer

Kelompok	Mencit					Mean±SD
	Jumlah Folikel Primer					
	1	2	3	4	5	
K-	4	4	3	1	2	2,8±1,304
K+	3	5	3	4	5	4,0±1,000
P1	4	5	8	7	7	6,2±1,643
P2	3	7	10	8	12	8,4±2,702
P3	15	8	10	9	13	11,0±2,915

Keterangan:

1. Kelompok negatif (K-): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB menggunakan sonde selama 14 hari
2. Kelompok positif (K+): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan vitamin C dosis 1,3 mg/25gBB menggunakan sonde selama 14 hari.
3. Perlakuan 1 (P1): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 18,2 mg/20gbb menggunakan sonde selama 14 hari.
4. Perlakuan 2 (P2): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 36,4 mg/20gbb menggunakan sonde selama 14 hari.
5. Perlakuan 3 (P3): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 72,8 mg/20gBB menggunakan sonde selama 14 hari.

Berdasarkan hasil menunjukkan jumlah folikel primer ovarium yang telah diberikan perlakuan bahwa kelompok perlakuan negatif memiliki jumlah terendah dibandingkan kelompok perlakuan yang lain karena hanya diberikan perlakuan berupa formaldehid. Sedangkan jumlah folikel primer tertinggi ditunjukkan pada kelompok perlakuan 3 yang diberikan formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 72,8 mg/20gBB. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak buah delima merah dapat mempengaruhi jumlah folikel primer ovarium mencit yang dipapar formaldehid.

Tabel 5. 3 Hasil uji normalitas

Kelompok Perlakuan	Nilai <i>P-Value</i> Shapiro-Wilk	Keterangan
K-	0,421	Distribusi data normal
K+	0,119	
P1	0,490	
P2	0,980	
P3	0,585	

Berdasarkan hasil analisis, dapat diperoleh bahwa nilai signifikansi $> 0,05$. Maka dapat dikatakan bahwa data jumlah folikel primer terdistribusi normal, sehingga asumsi normalitas dapat dipenuhi.

Tabel 5. 4 Hasil uji homogenitas

Kelompok Perlakuan	Nilai <i>P-Value</i> Levene's Statistic	Keterangan
K-		
K+		
P1	0,053	Homogen
P2		
P3		

Berdasarkan hasil uji homogenitas pada tabel 5.4, didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,053. Hal ini menyatakan bahwa data jumlah folikel primer terbukti homogen dengan signifikansi $> 0,05$.

Setelah dilakukan uji normalitas dan homogenitas diatas, diperoleh data yang normal dan homogen. Data dapat dikatakan terdistribusi normal dan homogen apabila *p-value* $> 0,05$. Kemudian dapat dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan *One Way* ANOVA. Hipotesis yang digunakan pada ANOVA adalah sebagai berikut:

H_0 = Pemberian ekstrak buah delima merah tidak berpengaruh terhadap jumlah

folikel primer ovarium yang telah dipapar formaldehid

Kriteria H_0 ditolak yaitu apabila nilai *p-value* (signifikansi) $< (\alpha) = 0,05$ (5%).

Tabel 5. 5 Hasil uji *One Way* ANOVA

Kelompok Perlakuan	Nilai <i>P-Value</i> <i>One Way</i> ANOVA	Keterangan
K-	0,000	Berbeda signifikan
K+		
P1		
P2		
P3		

Berdasarkan uji *One Way* ANOVA pada jumlah folikel primer dengan kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan 1, 2 dan 3 didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,000 lebih kecil jika dibandingkan dengan nilai α yaitu sebesar 0,05. Berdasarkan hasil pengujian maka H_0 ditolak karena terdapat perbedaan yang signifikan terhadap jumlah folikel primer dalam setiap kelompok perlakuan. Untuk mengetahui beda signifikan dari tiap kelompok perlakuan, dilakukan uji lanjutan yaitu *Post Hoc* LSD.

Tabel 5. 6 Hasil uji *Post-Hoc* LSD

Perlakuan	K-	K+	P1	P2	P3
K-		0,368	0,017*	0,000*	0,000*
K+	0,368		0,107	0,003*	0,000*
P1	0,017*	0,107		0,107	0,001*
P2	0,000*	0,003*	0,107		0,060
P3	0,000*	0,000*	0,001*	0,060	

Keterangan:

*: memiliki perbedaan signifikan

Hasil pengujian pada tabel 5.6 kemudian dapat disederhanakan untuk mempermudah membaca hasil analisis. Tabel 5.7 menunjukkan hasil penyederhanaan pengujian LSD yang telah dilakukan.

Tabel 5. 7 Hasil notasi *Post Hoc* LSD

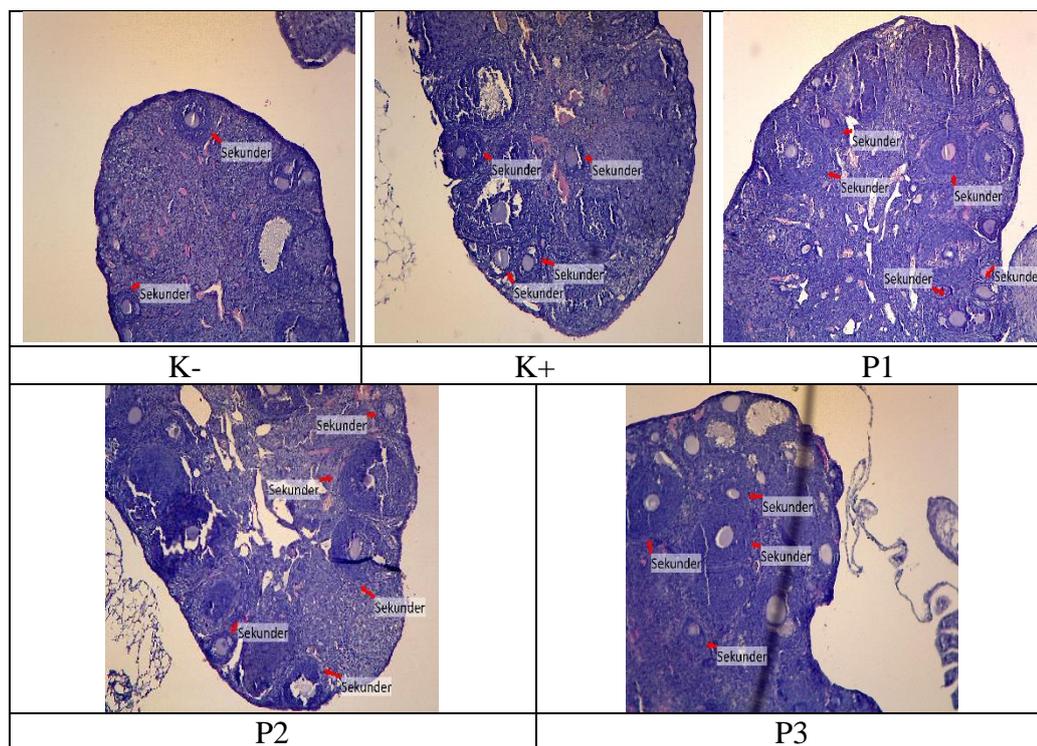
Perlakuan	Notasi
K-	a
K+	ab
P1	bc
P2	cd
P3	d

Keterangan: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan

Berdasarkan notasi huruf hasil uji *Post Hoc* LSD dapat dijelaskan bahwa kelompok kontrol negatif (K-) berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan (P1, P2, P3) namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif (K+). Kelompok kontrol positif (K+) berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan (P2 dan P3) namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan 1 (P1). Kelompok perlakuan 1 (P1) berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan 3 (P3) namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan 2 (P2). Kelompok perlakuan 2 (P2) tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 3 (P3).

5.4.2 Hasil Analisis Data Jumlah Folikel Sekunder

Hasil pengaruh dari ekstrak buah delima merah pada jumlah folikel sekunder ovarium diamati dari hasil preparat histologi ovarium mencit yang telah dilakukan pewarnaan dengan *hematoksilin-eosin*. Pengamatan histologi menggunakan mikroskop cahaya merek Olympus dengan perbesaran 100 kali. Hasil pengamatan berupa gambar diamati dengan *Software Image Raster 3.0*. Pengamatan dilakukan dari 4 lapang pandang yang berbeda. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui jumlah folikel sekunder ovarium pada tiap kelompok perlakuan secara mikroskopis.



Gambar 5. 8 Histologi folikel sekunder ovarium terlihat dengan menggunakan pewarnaan HE pada K-, K+, P1, P2, P3 dengan perbesaran 100x ditunjukkan oleh tanda panah merah

Hasil dari perhitungan jumlah folikel sekunder dari masing-masing sampel sebagai berikut:

Tabel 5. 8 Hasil perhitungan jumlah folikel sekunder

Kelompok \ Mencit	Jumlah Folikel Sekunder					Mean±SD
	1	2	3	4	5	
K-	1	2	2	3	3	2,2±0,837
K+	3	11	5	3	6	5,6±3,286
P1	6	6	12	7	9	8,0±2,549
P2	3	9	7	12	10	8,2±3,421
P3	7	12	9	10	8	9,2±1,924

Keterangan:

1. Kelompok negatif (K-): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB menggunakan sonde selama 14 hari
2. Kelompok positif (K+): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan vitamin C dosis 1,3 mg/25gBB menggunakan sonde selama 14 hari.
3. Perlakuan 1 (P1): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 18,2 mg/20gbb menggunakan sonde selama 14 hari.
4. Perlakuan 2 (P2): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 36,4 mg/20gbb menggunakan sonde selama 14 hari.
5. Perlakuan 3 (P3): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 72,8 mg/20gBB menggunakan sonde selama 14 hari.

Berdasarkan hasil menunjukkan jumlah folikel sekunder ovarium yang telah diberikan perlakuan bahwa kelompok perlakuan negatif memiliki jumlah terendah dibandingkan kelompok perlakuan yang lain karena hanya diberikan perlakuan berupa formaldehid. Sedangkan jumlah folikel sekunder tertinggi ditunjukkan pada kelompok perlakuan 3 yang diberikan formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 72,8 mg/20gBB. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak buah delima merah dapat mempengaruhi jumlah folikel sekunder ovarium mencit yang dipapar formaldehid.

Tabel 5. 9 Hasil uji normalitas

Kelompok Perlakuan	Nilai <i>P-Value</i> Shapiro Wilk	Keterangan
K-	0,314	Distribusi data normal
K+	0,179	
P1	0,207	
P2	0,814	
P3	0,928	

Berdasarkan hasil analisis, dapat diperoleh bahwa nilai signifikansi $> 0,05$. Maka dapat dikatakan bahwa data jumlah folikel sekunder berdistribusi normal, sehingga asumsi normalitas dapat dipenuhi.

Tabel 5. 10 Hasil uji homogenitas

Kelompok Perlakuan	Nilai <i>P-Value</i> Levene's Statistic	Keterangan
K-	0,263	Homogen
K+		
P1		
P2		
P3		

Berdasarkan hasil uji homogenitas pada tabel 5.10, didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,263. Hal ini menyatakan bahwa data jumlah folikel sekunder terbukti homogen dengan signifikansi $> 0,05$.

Setelah dilakukan uji normalitas dan homogenitas diatas, diperoleh data yang normal dan homogen. Data dapat dikatakan terdistribusi normal dan homogen apabila $p\text{-value} > 0,05$. Kemudian dapat dilanjutkan dengan uji parametrik menguankan *One Way* ANOVA. Hipotesis yang digunakna pada ANOVA adalah sebagai berikut:

H_0 = Pemberian ekstrak buah delima merah tidak berpengaruh terhadap jumlah folikel sekunder ovarium yang telah dipapar formaldehid

Kriteria H_0 ditolak yaitu apabila nilai $p\text{-value}$ (signifikasi) $< (\alpha) = 0,05$ (5%).

Tabel 5. 11 Hasil uji *One Way* ANOVA

Kelompok Perlakuan	Nilai <i>P-Value</i> <i>One Way</i> ANOVA	Keterangan
K-		
K+		
P1	0,003	Berbeda signifikan
P2		
P3		

Berdasarkan uji *One Way* ANOVA pada jumlah folikel sekunder dengan kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan 1, 2 dan 3 didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,003 lebih kecil jika dibandingkan dengan nilai α yaitu sebesar 0,05. Berdasarkan hasil pengujian maka H_0 ditolak karena terdapat perbedaan yang signifikan terhadap jumlah folikel sekunder dalam setiap kelompok perlakuan. Untuk mengetahui beda signifikan dari tiap kelompok perlakuan, dilakukan uji lanjutan yaitu *Post Hoc* LSD.

Tabel 5. 12 Hasil uji *Post-Hoc* LSD

Perlakuan	K-	K+	P1	P2	P3
K-		0,051	0,002*	0,002*	0,000*
K+	0,051		0,158	0,127	0,040*
P1	0,002*	0,158		0,904	0,471
P2	0,002*	0,127	0,904		0,548
P3	0,000*	0,040*	0,471	0,548	

Keterangan:

*: memiliki perbedaan signifikan

Hasil pengujian pada tabel 5.12 kemudian dapat disederhanakan untuk mempermudah membaca hasil analisis. Tabel 5.13 menunjukkan hasil penyederhanaan pengujian LSD yang telah dilakukan.

Tabel 5. 13 Hasil notasi *Post Hoc* LSD

Perlakuan	Notasi
K-	a
K+	ab
P1	bc
P2	bc
P3	c

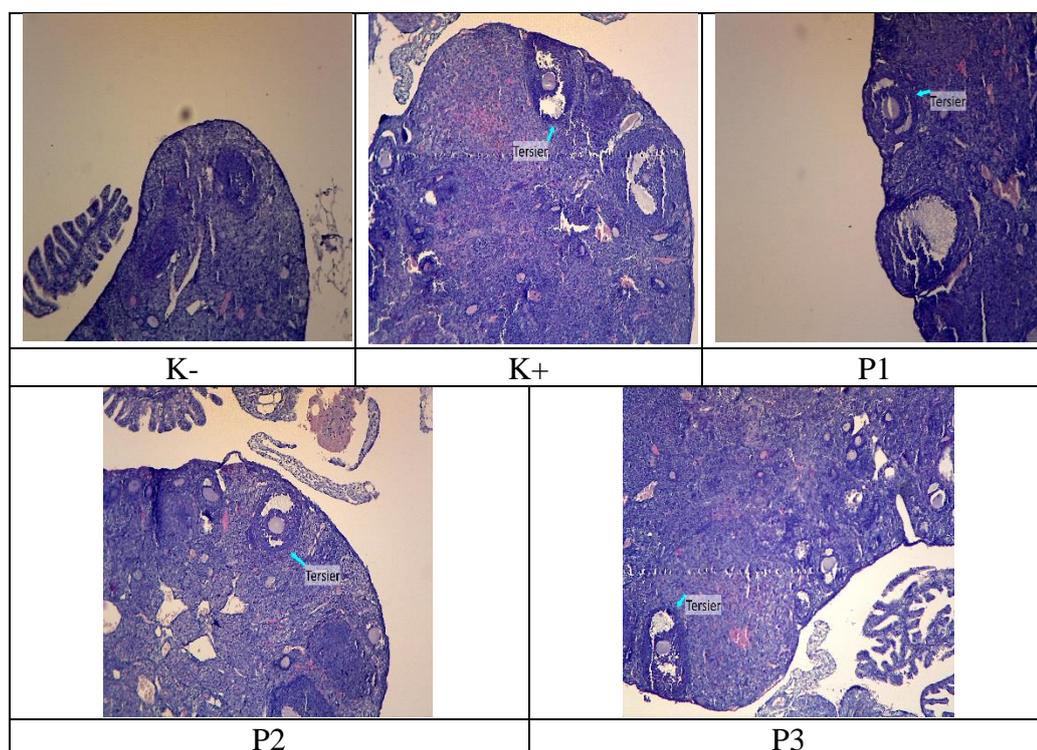
Keterangan: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan

Berdasarkan notasi huruf hasil uji *Post Hoc* LSD dapat dijelaskan bahwa kelompok kontrol negatif (K-) berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan (P1, P2, P3) namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif (K+). Kelompok kontrol positif (K+) berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan 3 (P3) namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan (P1 dan P2). Kelompok perlakuan (P1) tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan (P2 dan P3).

5.4.3 Hasil Analisis Data Jumlah Folikel Tersier

Hasil pengaruh dari ekstrak buah delima merah pada jumlah folikel sekunder ovarium diamati dari hasil preparat histologi ovarium mencit yang telah dilakukan pewarnaan dengan *hematoksilin-eosin*. Pengamatan histologi

menggunakan mikroskop cahaya merek Olympus dengan perbesaran 100 kali. Hasil pengamatan berupa gambar diamati dengan *Software Image Raster 3.0*. Pengamatan dilakukan dari 4 lapang pandang yang berbeda. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui jumlah folikel sekunder ovarium pada tiap kelompok perlakuan secara mikroskopis.



Gambar 5. 9 Histologi folikel tersier ovarium terlihat dengan menggunakan pewarnaan HE pada K-, K+, P1, P2, P3 dengan perbesaran 100x ditunjukkan oleh tanda panah toska

Hasil dari perhitungan jumlah folikel tersier dari masing-masing sampel sebagai berikut:

Tabel 5. 14 Hasil perhitungan jumlah folikel tersier

Mencit Kelompok	Jumlah Folikel Tersier					Mean±SD
	1	2	3	4	5	
K-	-	-	-	-	-	0
K+	-	-	-	1	-	0,2±0.447
P1	1	-	-	-	-	0,2±0.447
P2	1	1	-	-	-	0,4±0.548
P3	-	1	1	-	1	0,6±0.548

Keterangan:

1. Kelompok negatif (K-): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB menggunakan sonde selama 14 hari
2. Kelompok positif (K+): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan vitamin C dosis 1,3 mg/25gBB menggunakan sonde selama 14 hari.
3. Perlakuan 1 (P1): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 18,2 mg/20gbb menggunakan sonde selama 14 hari.
4. Perlakuan 2 (P2): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 36,4 mg/20gbb menggunakan sonde selama 14 hari.
5. Perlakuan 3 (P3): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 72,8 mg/20gBB menggunakan sonde selama 14 hari.

Berdasarkan hasil menunjukkan jumlah folikel tersier ovarium yang telah diberikan perlakuan bahwa kelompok perlakuan negatif memiliki jumlah terendah dibandingkan kelompok perlakuan yang lain karena hanya diberikan perlakuan berupa formaldehid. Sedangkan jumlah folikel tersier tertinggi ditunjukkan pada kelompok perlakuan 3 yang diberikan formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 72,8 mg/20gBB. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak buah delima merah dapat mempengaruhi jumlah folikel tersier ovarium mencit yang dipapar formaldehid.

Tabel 5. 15 Hasil uji normalitas

Kelompok Perlakuan	Nilai P-Value Shapiro-Wilk	Keterangan
K-	-	Distribusi data tidak normal
K+	0,000	
P1	0,000	
P2	0,006	
P3	0,006	

Hasil dari uji normalitas, dapat diperoleh bahwa nilai signifikansi $< 0,05$, sehingga dinyatakan bahwa data jumlah folikel tersier ovarium dalam penelitian ini tidak menyebar mengikuti distribusi normal.

Tabel 5. 16 Hasil uji homogenitas

Kelompok Perlakuan	Nilai <i>P-Value</i> Levene's Statistic	Keterangan
K-		
K+		
P1	0,003	Tidak homogen
P2		
P3		

Hasil uji homogenitas ragam pada variabel jumlah folikel tersier adalah 0.003. Berdasarkan hasil analisis dapat diketahui bahwa untuk variabel jumlah folikel tersier nilai signifikansi $< 0,05$. Artinya untuk pada variabel jumlah folikel tersier dalam penelitian ini memiliki ragam yang tidak homogen.

Berdasarkan hasil uji asumsi normalitas didapatkan bahwa pada variabel jumlah folikel tersier tidak memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas. Dengan demikian untuk variabel jumlah folikel tersier, uji beda dilakukan dengan menggunakan uji Kruskal Wallis.

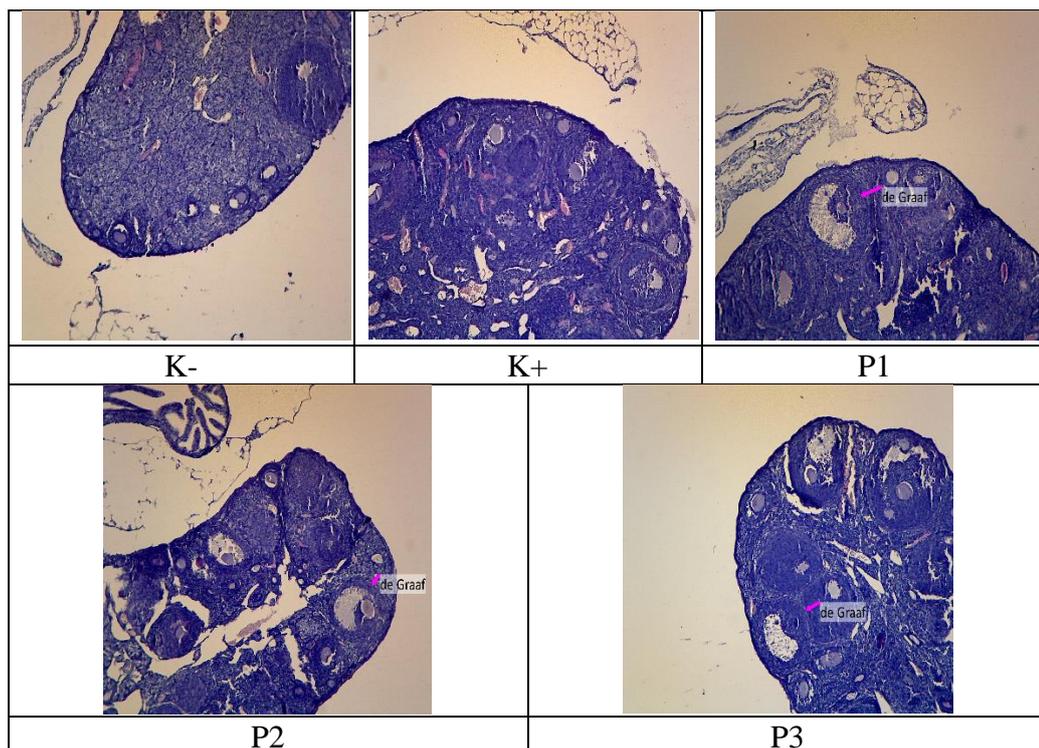
Tabel 5. 17 Hasil uji Kruskal Wallis

Kelompok Perlakuan	Nilai <i>P-Value</i> Kruskal Wallis	Keterangan
K-		
K+		
P1	0,292	Tidak berbeda signifikan
P2		
P3		

Berdasarkan uji Kruskal Wallis pada jumlah folikel tersier ovarium mencit didapatkan nilai signifikansi 0,292 ($p < 0,05$), maka berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan jumlah folikel tersier pada mencit dengan kontrol negatif, kontrol positif, dan yang mendapat perlakuan 1,2, dan 3.

5.4.4 Hasil Analisis Data Jumlah Folikel *de Graaf*

Hasil pengaruh dari ekstrak buah delima merah pada jumlah folikel *de Graaf* ovarium diamati dari hasil preparat histologi ovarium mencit yang telah dilakukan pewarnaan dengan *hematoksin-eosin*. Pengamatan histologi menggunakan mikroskop cahaya merek Olympus dengan perbesaran 100 kali. Hasil pengamatan berupa gambar diamati dengan *Software Image Raster 3.0*. Pengamatan dilakukan dari 4 lapang pandang yang berbeda. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui jumlah folikel *de Graaf* ovarium pada tiap kelompok perlakuan secara mikroskopis.



Gambar 5. 10 Histologi folikel *de Graaf* ovarium terlihat dengan menggunakan pewarnaan HE pada K-, K+, P1, P2, P3 dengan perbesaran 100x ditunjukkan oleh tanda panah pink

Hasil dari perhitungan jumlah folikel *de Graaf* dari masing-masing sampel sebagai berikut:

Tabel 5. 18 Hasil perhitungan jumlah folikel *de Graaf*

Kelompok	Mencit	Jumlah Folikel de Graaf					Mean±SD
		1	2	3	4	5	
K-		-	-	-	-	-	0
K+		-	-	-	-	-	0
P1		-	1	-	-	-	0,2±0,447
P2		1	-	-	-	1	0,4±0,548
P3		1	1	-	1	-	0,6±0,548

Keterangan:

1. Kelompok negatif (K-): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB menggunakan sonde selama 14 hari
2. Kelompok positif (K+): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan vitamin C dosis 1,3 mg/25gBB menggunakan sonde selama 14 hari.
3. Perlakuan 1 (P1): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 18,2 mg/20gbb menggunakan sonde selama 14 hari.
4. Perlakuan 2 (P2): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 36,4 mg/20gbb menggunakan sonde selama 14 hari.
5. Perlakuan 3 (P3): Mencit diberi formaldehid dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 72,8 mg/20gBB menggunakan sonde selama 14 hari.

Berdasarkan hasil menunjukkan jumlah folikel *de Graaf* ovarium yang telah diberikan perlakuan bahwa kelompok perlakuan negatif memiliki jumlah terendah dibandingkan kelompok perlakuan yang lain karena hanya diberikan perlakuan berupa formaldehid. Sedangkan jumlah folikel *de Graaf* tertinggi ditunjukkan pada kelompok perlakuan 3 yang diberikan formaldehid 10% dosis 2,8 mg/20gBB dan ekstrak buah delima merah dosis 72,8 mg/20gBB. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak buah delima merah dapat mempengaruhi jumlah folikel *de Graaf* ovarium mencit yang dipapar formaldehid.

Tabel 5. 19 Hasil uji normalitas

Kelompok Perlakuan	Nilai <i>P-Value</i> Shapiro-Wilk	Keterangan
K-	-	Distribusi data tidak normal
K+	-	
P1	0,000	
P2	0,006	
P3	0,006	

Hasil dari uji normalitas, dapat diperoleh bahwa nilai signifikansi $< 0,05$, sehingga dinyatakan bahwa data jumlah folikel *de Graaf* ovarium dalam penelitian ini tidak menyebar mengikuti distribusi normal.

Tabel 5. 20 Hasil uji homogenitas

Kelompok Perlakuan	Nilai <i>P-Value</i> Levene's Statistic	Keterangan
K-		
K+		
P1	0,000	Tidak homogen
P2		
P3		

Hasil uji homogenitas ragam pada variabel jumlah folikel *de Graaf* adalah 0.000. Berdasarkan hasil analisis dapat diketahui bahwa untuk variabel jumlah folikel *de Graaf* nilai signifikansi $< 0,05$. Artinya untuk pada variabel jumlah folikel *de Graaf* dalam penelitian ini memiliki ragam yang tidak homogen.

Berdasarkan hasil uji asumsi normalitas didapatkan bahwa pada variabel jumlah folikel *de Graaf* tidak memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas. Dengan demikian untuk variabel jumlah folikel *de Graaf*, uji beda dilakukan dengan menggunakan uji Kruskal Wallis.

Tabel 5. 21 Hasil uji Kruskal Wallis

Kelompok Perlakuan	Nilai <i>P-Value</i> Kruskal Wallis	Keterangan
K-		
K+		
P1	0,128	Tidak berbeda signifikan
P2		
P3		

Berdasarkan uji Kruskal Wallis pada jumlah folikel *de Graaf* ovarium mencit didapatkan nilai signifikansi 0,128 ($p > 0,05$), maka berarti tidak terdapat

perbedaan yang signifikan jumlah folikel *de Graaf* pada mencit dengan kontrol negatif, kontrol positif, dan yang mendapat perlakuan 1,2, dan 3.

5.5 Pengaruh Ekstrak Buah Delima Merah terhadap Jumlah Folikel Ovarium

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya dan bersifat reaktif. Formaldehid adalah senyawa organik golongan aldehyd atau alkanal yang paling sederhana (Mahdi, 2008). Keberadaannya dalam tubuh dapat berperan sebagai sumber *reactive oxygen species* (ROS) dan radikal bebas, yang bersifat merusak sel dan jaringan organ, termasuk ovarium (Anggraini, 2017).

Formaldehid yang masuk ke dalam tubuh akan dimetabolisme menjadi asam format oleh *Aldehyde dehydrogenase 2* (ALDH₂) yang berada di mitokondria sel dan oleh *Alcohol dehydrogenase 3* (ADH₃) yang berada di sitosol (Teng *et al*, 2001). Melalui tahapan metabolisme ini, pembentukan asam format ini secara langsung mengurangi jumlah antioksidan alami dalam tubuh berupa *glutathione* (GSH). Penurunan antioksidan *glutathione* (GSH) sebagai antioksidan alami menyebabkan peningkatan terbentuknya radikal bebas. Paparan formaldehid yang terjadi secara terus-menerus menyebabkan terbentuknya produk asam format secara berlebihan. Paparan formaldehid yang berlebih akan mengakibatkan penurunan *glutathione* (GSH) sehingga asam format semakin menumpuk dan menyebabkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Kumar, 2013).

Akibatnya kadar ROS meningkat menyebabkan molekul reaktif meningkat juga. Sehingga terjadi proses stres oksidatif. Gangguan ini disebabkan karena adanya gangguan hipotalamus - hipofisis dan ovarium sehingga terjadi gangguan

proses folikulogenesis. Stres oksidatif menginduksi aktivasi dari hipotalamus-hipofisisadrenal (HPA) axis. Hipotalamus akan mensekresikan *corticotrophin releasing hormone* (CRH) yang memacu hipofisis anterior untuk memproduksi *adenocorticotrophin hormone* (ACTH). *Adenocorticotrophin hormone* melalui aliran darah, mencapai kelenjar adrenal kemudian membuat kelenjar adrenal mensekresikan suatu hormon sebagai respons adaptif tubuh terhadap stres yaitu glukokortikoid (kortisol pada manusia, kortikosteron pada hewan pengerat). Glukokortikoid tidak hanya terlibat dalam respon stres tetapi juga merupakan mediator penting untuk peristiwa lain seperti apoptosis (Regan *et al*, 2018). Jumlah berlebih dari kortisol dapat mengganggu perkembangan dan pertumbuhan folikel (Setiyono, 2015).

Salah satu cara meredam dampak negatif dari senyawa radikal bebas akibat paparan formaldehid adalah dengan menggunakan antioksidan. Antioksidan mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali serta mengikat radikal bebas (Winarsi, 2007). Antioksidan alami dapat diperoleh melalui tumbuhan. Salah satu tumbuhan yang banyak mengandung senyawa antioksidan adalah buah delima merah (*Punica granatum* L.) yang memiliki kandungan polifenol yang terdiri dari flavonoid (antosianin, katekin, dan flavonoid kompleks lainnya) dan tanin terhidrolisis (punicallagin, pedunculagin, punicalagin, ellagic acid) (Aviram *et al*, 2008). Berdasarkan hasil penelitian melalui uji reaksi warna dan KLT pada buah delima merah mengandung senyawa polifenol (flavonoid, fenol, dan tannin).

Kandungan polifenol dalam ekstrak dapat menghambat radikal bebas melalui mekanisme penangkapan radikal dengan cara menyumbangkan satu elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas, sehingga jumlah radikal bebas berkurang (Harborne, 1987). Senyawa fenolik memiliki aktivitas antioksidatif dengan kemampuan mendonorkan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam (Redha, 2010).

Hasil penelitian dari pemberian ekstrak buah delima merah dengan dosis 18,2 mg/20gBB, dosis 36,4 mg/20gBB, dosis 72,8 mg/20gBB mencit per hari dapat berpengaruh pada folikel ovarium yang ditandai dengan meningkatnya jumlah folikel ovarium pada dosis ekstrak buah delima merah. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak buah delima merah yang mengandung senyawa flavonoid, fenol, dan tanin bersifat antioksidan terhadap radikal bebas formaldehid.

Peningkatan jumlah folikel primer, sekunder, tersier, dan *de Graaf* pada dosis tersebut dikarenakan adanya zat aktif golongan flavonoid yang terkandung pada ekstrak buah delima merah memiliki sifat estrogenik sehingga dapat mempengaruhi sistem hormonal serta menyebabkan perbaikan pada ovulasi dan fertilisasi (Unitly, 2011). Menurut Suheimi (2007) mengemukakan bahwa pada sel-sel granulosa terdapat reseptor-reseptor hormon LH-FSH. Sebagaimana reseptor FSH yang berfungsi untuk mengendalikan perkembangan folikel.

Kehadiran hormon FSH dan LH sangat penting untuk perkembangan menuju folikel. Menurut Kiptiyah (2002), pertumbuhan folikel dipengaruhi kadar FSH yang ada di dalam ovarium, sehingga folikel-folikel primer dan sekunder dapat berkembang baik. Hal ini dapat dipahami karena pada saat awal perkembangan

folikel diperlukan FSH dalam jumlah yang cukup untuk mendorong perkembangan folikel menuju fase selanjutnya.

Jumlah folikel primer dan folikel sekunder terlihat semakin banyak bila dibandingkan kelompok kontrol negatif dan menjadi lebih banyak dengan peningkatan dosis ekstrak buah delima merah yang diberikan. Hal ini menandakan bahwa jumlah folikel primer dan folikel sekunder semakin meningkat pada dosis ekstrak delima merah yang semakin meningkat. Uji statistik dengan menggunakan *One Way ANOVA* maka didapatkan hasil folikel primer sebesar 0,000 ($p < 0,05$) dan folikel sekunder sebesar 0,003 ($p < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa jumlah folikel primer pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 berbeda secara signifikan. Pada penelitian yang dilakukan Krismayanti (2009) menyatakan bahwa mencit yang dipaparkan formaldehid dengan dosis bertingkat memiliki jumlah folikel primer yang lebih sedikit seiring dengan pemberian dosis formaldehid yang bertingkat. Stres oksidatif mampu menyebabkan jejas sel pada folikel primordial maupun primer yang sangat rentan terhadap stres oksidatif, selain itu lingkungan sel menjadi apoptosis yang akhirnya terjadi kematian sel/atresia.

Lingkungan yang mengandung banyak oksidan di dalam stroma ovarium oleh karena aliran darah yang membawa formaldehid hingga ke dalam ovarium menyebabkan lingkungan tersebut tidak kondusif untuk pertumbuhan folikel. Apoptosis yang terjadi pada folikel yang mengalami stres oksidatif tidak hanya disebabkan oleh gangguan pada sel granulosa namun apoptosis tersebut dapat disebabkan juga oleh fragmentasi DNA pada oosit yang menyebabkan gangguan

pada protein yang masing-masing dikeluarkan oleh sel granulosa-oosit sehingga apoptosis terjadi (Chung *et al.*, 2013)

Hasil penelitian ini mendukung penelitian dan teori sebelumnya yang menyatakan bahwa folikel primer dan folikel sekunder memiliki reaksi terhadap antioksidan yang diberikan. Pemberian ekstrak buah delima merah bertujuan untuk menurunkan stres oksidatif, meningkatkan MOMP, menjaga keseimbangan bax-bcl-2, menurunkan ekspresi caspase-3 dan menurunkan apoptosis pada folikel.

Hasil dari perhitungan secara distribusi dapat kita ketahui bahwa terjadi peningkatan jumlah folikel tersier seiring dengan peningkatan dosis ekstrak buah delima merah, namun secara statistik tidak terdapat perbedaan signifikan. Meski tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada jumlah folikel tersier mencit yang diterapi dengan ekstrak buah delima merah, namun dibutuhkan penelitian lebih lanjut untuk menilai kualitas dari folikel. Mengingat perkembangan folikel (folikulogenesis) ini tidak hanya berkaitan dengan pertumbuhan sel granulosa, namun juga berkaitan dengan sistem intrakrin, parakrin, dan autokrin yang juga berkaitan dengan pematangan dari oosit dan steroidogenesis. Sehingga meski tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada jumlah folikel tersier pada penelitian ini, namun mengingat pada penelitian sebelumnya, bahwa paparan formaldehid yang terjadi selama 12 hari mampu merusak folikulogenesis yang terjadi (Krismayanti, 2009).

Folikel *de Graaf* merupakan folikel yang berkembang dari folikel tersier, jika perkembangan ini gagal, maka perkembangan sel menuju tahap berikutnya tidak akan terjadi. Penelitian sebelumnya menyebutnya meski mengalami stres

oksidatif, folikel *de Graaf* memiliki mekanisme pertahanan melawan stres oksidatif yang lebih potent dibandingkan dengan folikel yang lebih kecil (Agarwal *et al.*, 2012). Namun hasil penelitian menunjukkan folikel *de Graaf* pada kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif tidak memiliki folikel *de Graaf*, demikian dapat disimpulkan bahwa stres oksidatif yang disebabkan oleh paparan formaldehid menimbulkan jejas yang cukup berat pada sel granulosa. Fungsi dari folikel sendiri akan menjadi terganggu dengan tidak adanya folikel *de Graaf*. Akan menyebabkan gangguan sehingga tidak akan terjadi ovulasi sehingga menjadi siklus menstruasi menjadi anovulatoir, jika hal ini terus menerus terjadi maka akan menyebabkan gangguan kesuburan pada wanita. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa pada wanita yang mengalami siklus menstruasi anovulatoir, kadar hormon gonad lebih rendah daripada wanita yang mengalami siklus menstruasi dengan ovulasi (Yang *et al.*, 2013).

Pemberian ekstrak buah delima merah pada kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 dengan dosis 18,2 mg/20gBB, dosis 36,4 mg/20gBB, dan dosis 72,8 mg/20gBB menyebabkan munculnya folikel *de Graaf* meski secara statistik tidak bermakna. Keadaan stres oksidatif yang disebabkan oleh adanya paparan formaldehid mampu merusak intrafollicular network yang ada di dalam folikel. Beberapa protein antiapoptosis yang ada pada folikel antara lain FSH, activin, dan estrogen. Namun untuk selamat dari atresia, folikel dominan yang akan bertumbuh menjadi folikel *de Graaf* memiliki reseptor FSH yang paling dominan di antara folikel yang lainnya, dengan adanya reseptor ini maka folikel mampu menangkap FSH yang dihasilkan oleh hipofisis dan kemudian tumbuh dan berkembang, defek pada

reseptor FSH ini yang disebabkan oleh stres oksidatif mampu menyebabkan sel menjadi tidak berkembang dan menghasilkan androgen yang dominan sehingga menjadi apoptosis dan atresia (Speroff *et al.*, 2011). Pemberian antioksidan berupa ekstrak buah delima merah terbukti mampu memunculkan folikel *de Graaf* sehingga dimungkinkan terdapat perbaikan dari sistem intrakrin, parakrin, dan autokrin yang ada pada folikel antral hingga menjadi *de Graaf*.

5.6 Integrasi Al-Qur'an

Allah SWT telah menciptakan semua yang ada di bumi untuk manusia. Tidak hanya untuk dimanfaatkan, tetapi untuk mengambil pelajaran dari segala yang telah Allah SWT ciptakan. Sama halnya dengan tanaman atau tumbuhan, Allah SWT menciptakannya dengan fungsi untuk manusia. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Al-Qur'an surah Az-Zumar ayat 21:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنْبِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُخْتَلِفًا
أَلْوَانُهُ ثُمَّ يَهَيِّجُ فَتَرَهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَامًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرًا لِأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿٢١﴾

Artinya: “*Tidakkah engkau memperhatikan bahwa Allah menurunkan air (hujan) dari langit, lalu Dia mengalirkannya menjadi sumber-sumber air di bumi. Kemudian, dengan air itu Dia tumbuhkan tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, kemudian ia menjadi kering, engkau melihatnya kekuning-kuningan, kemudian Dia menjadikannya hancur berderai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi ululalbab*”. (QS. Az-Zumar:21)

Imam Ibnu Katsir telah menyampaikan maksud dari kata “*tanaman-tanaman yang bermacam-macam warnanya*” yaitu bermacam-macam rasa, bau, bentuk, dan manfaatnya, tidak hanya terbatas pada macam warnanya saja (Katsir, 1994). Hal ini berarti bahwa apapun yang Allah SWT tumbuhkan memiliki manfaat. Jadi dapat diintegrasikan atau dihubungkan antara ayat tersebut dengan penelitian ini yaitu dari seluruh tumbuhan yang diciptakan oleh Allah SWT, saling

berbeda satu dengan yang lain. Rasa, bau, dan bentuk yang berbeda-beda pada tanaman menunjukkan bahwa tanaman tersebut mengandung senyawa atau zat-zat yang berbeda pula. Maka kita sebagai manusia diperintahkan untuk mengambil pelajaran dari hal-hal tersebut sehingga berbagai macam tanaman yang ditumbuhkan dan diciptakan di dunia dapat diketahui lebih banyak lagi kandungan dan kegunaannya, khususnya buah delima merah pada penelitian ini.

Ekstrak buah delima merah yang digunakan dalam penelitian ini terbukti memiliki manfaat sebagai antioksidan alami bagi tubuh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak buah delima merah mengandung senyawa aktif golongan flavonoid, tanin. Selain itu, ekstrak buah delima merah juga dapat mengurangi dampak negatif dari radikal bebas formaldehid berupa asam format dan memiliki pengaruh terhadap jumlah folikel ovarium mencit betina. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka ekstrak buah delima merah memiliki peran sebagai salah satu tindakan pencegahan paparan radikal bebas terhadap tubuh.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak buah delima merah (*Punica granatum* L.) mengandung senyawa golongan flavonoid, fenol, dan tanin yang diidentifikasi menggunakan uji warna.
2. Ekstrak buah delima merah (*Punica granatum* L.) mengandung senyawa golongan ellagitanin yang diidentifikasi menggunakan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT).
3. Ekstrak buah delima merah (*Punica granatum* L.) berpengaruh terhadap folikel primer dan folikel sekunder ovarium mencit betina yang diberi paparan formaldehid tetapi tidak berpengaruh terhadap folikel tersier dan folikel *de Graaf* ovarium mencit betina yang diberi paparan formaldehid

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian diatas, dapat disarankan sebagai berikut:

1. Penelitian serupa dengan menggunakan dosis yang lebih tinggi
2. Penelitian selanjutnya mengenai ketebalan uterus

DAFTAR PUSTAKA

- Adawiah., *et al.* 2015. Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Komponen Bioaktif Sari Buah Namnam. *Jurnal Kimia Valensi*. Volume 1, Nomor 2.
- Agarwal A, Mellado A.A, Premkumar B. J, Shaman A., Gupta S. 2012. The Effects of Oxidative Stress on Female Reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. Vol 10, No 49.
- Andriani, V. 2016. Karakterisasi Anatomi Delima merah (*Punica granatum L.*). *Journal of Science*. Volume 9, Nomor 2
- Anggraini, Dian. 2017. Pengaruh Dosis Pemberian Ekstrak Buah Delima merah (*Punica granatum Linn*) Terhadap Ekspresi Caspase-3 dan Folikulogenesis pada Mencit (*Mus musculus*) yang Dipapar Formaldehyde. *Tesis*. Program Studi S2 Ilmu Kesehatan Reproduksi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
- Anwar, R. 2005. *Morfologi dan Fungsi Ovarium*. Bandung: Unpad Press
- Arnanda, Quinz eilla Putri dan Rina Fajri Nuwarda. 2019. Penggunaan Radiofarmaka Teknesium-99m Dari Senyawa Glutation Dan Senyawa Flavonoid Sebagai Deteksi Dini Radikal Bebas Pemicu Kanker. *Farmaka*. Volume 17, Nomor 2.
- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai danPotensinya sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. Vol 13, No 2.
- Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, Hayek T, Presser D, Fuhrman B. 2008. Pomegranate Juice Cosumption Reduces oxidative Stress, Atherogenic Modifications to LDL and Platelet Aggregation: Studies in Humans and in Atherosclerotic Apolipoprotein E Deficient Mice. *American Journal Clinical Nutrition*.
- BPOM. 2017. *Data Hasil Sidak Keamanan Pangan BPOM Juli 2017*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan
- BPOM. 2019. *Laporan Tahunan BPOM 2019*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan
- Chung YC., Lu LC., Tsai MH., Chen YJ, Chen YY., Yao SP., Hsu CP. 2013. The Inhibitory Effect of Ellagic Acid on Cell Growth on Ovarian Carcinoma Cells. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*. Volume 2013:306705
- Dahlan, M.S. 2014. *Statistik Untuk Kedokteran dan Kesehatan Edisi 6*. Jakarta : Salemba Medika

- Desinta, T. 2015. Penentuan Jenis Tanin Secara Kualitatif dan Penetapan Kadar Tanin dari Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Secara Permanganometri. *CALYPTRA*. Vol 4(1)
- Edrizal, B and Novera, Y. 2019. Efektifitas Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum* L.) secara Topikal Terhadap Proses Pembentukan Kembali (Remodeling) pada Fraktur Tulang Paha Tikus Putih Galur Wistar Betina (*Rattus novergicus*). *Jurnal Menara Ilmu*. Vol 13, No 10.
- Ellis, Harold. 2006. *Clinical Anatomy: Applied Anatomy for Student & Junior Doctors*. 11th edition. USA: Blackwell Publishing.
- Fadhilah, Siti. 2017. Pengaruh Dosis Pemberian Ekstrak Buah Delima merah (*Punica granatum* Linn) Terhadap Apoptosis Sel Granulosa Ovarium dan Kadar 17-B Estradiol pada Mencit (*Mus musculus*) yang Dipapar Formaldehyde. *Tesis*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
- Fauziyah A & Dwijananti P. 2013. Pengaruh Radiasi Sinar X terhadap Motilitas Sperma pada Tikus Mencit (*Mus musculus*). *Unnes Physic Journal 2* (2).
- Fereeder, W. 1991. *Statistic and Society: Data Collection and Interpretation*. Now York: Marcel Dekker.
- Fernandes, R., Trindade, M., & Melo, M. 2018. *Natural Antioxidant and Food Applicatoin: Healthy Perspective*. London: Elsevier Inc.
- Ganong, W. F. 2003. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran* Edisi 20. Jakarta: EGC.
- Gougeon, A. 2004. *Dynamics of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional Aspects*. In (Leung Peter, 2004) *The Ovary*. 2nd Edition.
- Guyton, AC, Hall. 2006. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran* Edisi 11. Penerjemah : Irawati, Ramadani D, Indriyani F. Jakarta: EGC
- Hani, Rani Cyinthia dan Tiana Milanda. 2016. Review: Manfaat Antioksidan pada Tanaman Buah di Indonesia. *Farmaka*. Voume 14, Nomor 1.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Edisi I. Bandung: ITB Press.
- Hariana, Arief. 2008. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya Seri 2*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Harling, Viharianana N.V. 2019. Aktivitas Penangkap Radikal Bebas Ekstrak Metanol Kulit Buah dan Biji Buah Delima merah (*Punica granatum* L). *SOSCIED*. Vol 2, No 2.
- Hasanah, Annisa. 2015. Efek Jus Bawang Bombay (*Allium cepa* Linn.) Terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit yang diinduksi Streptozoin (STZ). *Jurnal Ilmu Kesehatan dan Kedokteran Keluarga*. Volume 11, Nomor 2.

- Hernawan, dan Ahmad. 2003. Review: Ellagitannin; Biosintesis, Isolasi, dan Aktivitas Biologi. *Biofarmasi*. Vol 1. No 1
- Hernawati, et al. 2013. Efek Ekstrak Buah Delima merah (*Punica granatum L.*) Terhadap Ekspresi Wild p53 pada Sel Ganas Rongga Mulut Mencit Strain Swiss Webster. *Dental Journal*. Volume. 46. Nomor. 03.
- Hestiantoro A, Soebijanto S. 2013. *Konsensus Penanganan Infertilitas*. Himpunan Endokrinologi Reproduksi dan Fertilitas Indonesia (HIFERI), Perhimpunan Fertilisasi In Vitro Indonesia.
- HIFERI. 2013. *Konsensus Penanganan Infertilitas*. Himpunan Endokrinologi Reproduksi dan Fertilitas Indonesia. (PERFITRI), Ikatan Ahli Urologi Indonesia (IAUI), Dan Perkumpulan Obstetri Dan Ginekologi Indonesia (POGI).
- Iling, Ilmiati., Wulan Safitri., Erfiana. 2017. Uji Fitokimia Ekstrak Buah Dengan. *Jurnal Dinamika*. Vol 08, No1.
- Isnaeni, Wiwi.2006. *Fisiologi Hewan*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Jauhari, A. 2013. *Dasar-dasar Ilmu Gizi*. Yogyakarta: Jaya Ilmu.
- Karima, Is dan Sri Widyarti. 2016. Studi Gen Parp-1 Ekson 23 pada Testis Mencit Setelah Induksi Formalin: Tidak Terdeteksi Mutasi. *Jurnal Biotropika*. Vol 4 No 1.
- Kartika, A. A., H.C. H. Siregar., A. M. Fuah. 2013. Strategi Pengembangan Usaha Ternak Tikus (*Rattus norvegicus*) dan Mencit (*Mus musculus*) di Fakultas Peternakan IPB. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*. Vol 01, No 3.
- Kemenkes RI. 2012. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 33 Tahun 2012 tentang Bahan Tambahan Pangan.
- Khunaifi. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Steenis) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Kiptiyah, 2002. Efek Teratogenik Vitamin A pada Mencit (*Mus musculus*) Betina. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Airlangga
- Klaassen, CD. 2001. *Casarett and Doull's Toxicology the basic science of poisons*. New York : Mc Graw Hill
- Kothari, S., Tompson A., Amggarwal A., du Plessis. 2011. Free Radicals: Their Benefical and Detrimental Effect on Sperm Function. *Indian Journal of Experimental Biology*. Volume 48, Nomor 5.
- Krismayanti. 2009. Pengaruh Paparan Formalin terhadap Folikulogenesis Ovaarium Mencit (*Mus musculus L.*). *Tesis*. Surabaya: Universitas Airlangga

- Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL, 2013. editors. Robbins Basic Pathology 9 th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders.
- Kumar, *et al.* 2013. Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology For Isolation of Bioactive Compounds From Medicinal Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. Volume. 18. Nomor. 01.
- Lailani *et al.*, 2013. Gambaran Tekanan Darah Tikus Wistar Jantan dan Betina Setelah Pemberian Diet Tinggi Garam. *Jurnal Kesehatan Andalas*. Volume. 2. Nomor. 3
- Lean, M. 2013. *Ilmu Pangan, Gizi dan Kesehatan Edisi 7*. Yogyakarta:Pustaka Pelajar.
- Leeson, R.C., T.S. Leeson., A.A. Paparo. 1996. *Buku Ajar Histologi. Edisi ke 5*. Jakarta : EGC Penerbit Buku Kedokteran
- Lie, Jin et al. 2012. Phenolic Compound and Antioxidan Activity of Bulb Extract of Six *Lilium* Species Native to China. *Molecules*: 2012
- Lu, Kacew S.2009. *Lu's Basic Toxicology*. New York: Informa Healthcare
- Lung, Jackie Kang Sing dan Dika Pramita Destiani. Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin A, C, E dengan metode DPPH. *Farmaka*. Volume 15, Nomor 1.
- Mahdi, Chanif. 2008. Efek Paparan Formaldehid dan Suplementasi Yogurt terhadap Aktivitas Antioksidan Kerusakan Oksidatif, Profil dan Karakter Protein Jaringan Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*). Tesis. Program Studi Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Malole, M.B.M. & C.S., Pramono. 1989. *Penggunaan Hewan-hewan Percobaan Laboratorium. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan*. Bogor: Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi–Institut Pertanian Bogor.
- Margono, S. 2010. *Metode Penelitian Pendidikan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Martini, F., et al. 2012. *Fundamentals of Anatomy & Physiology* (9 ed.). San Fransisco: Pearson Education.
- Masoumi S. Z., Parsa P., Darvish N. B. S., Mokhtari S., Yavangi M., Roshanaei G. T. 2015. An Epidemiologic Survey on the Causes of Infertility in Patients Referred to Infertility Center in Fatemieh Hospital in Hamadan. *Iran J Reprod Med*. Vol 13(8):513-516
- Matheos, H *et al.* 2104, Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Daun Kayu Bulan (*Pisonia alba*). *Jurnal Ilmiah Farmasi*, Vol. 3, No 3.
- Megawati, Annik dan Sofa Yuliana. 2019. Uji Efek Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) Terhadap Penurunan Kadar

- Asam Urat Tikus Wistar yang Diinduksi Potasium Oksanat Secara In Vivo. *Cendekia Journal of Pharmacy*. Vol 3, No 2.
- Muchtadi, D. 2013. *Antioksidan dan Kiat Sehat Di Usia Reproduksi*. Bandung: Alfabeta.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. Volume. VII. Nomor. 02.
- Muliani, Hirawati. 2011. Pertumbuhan Mencit (*Mus Musculus L.*) Setelah Pemberian Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas L.*). *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. Vol XIX. No 1.
- Muthmainnah, B. 2017. Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etanol Buah Delima merah (*Punica granatum L.*) dengan Metode Uji Warna. *Media Farmasi*. Vol 13, No 2.
- Nababan, Donal., et al. 2018. Analisis Kandungan Formaldehid Pada Tahu yang Dijual di Pasar Kota Medan. *Jurnal Kesehatan Masyarakat dan Lingkungan Hidup*. Vol 1, No 1.
- Noviyanti, 2016. Pengaruh Kepolaran Pelarut Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Brazil Batu (*Psidium Guineense L.*) Dengan Metode DPPH. *Jurnal Farmako Bahari*. Vol. 7; No. 1;
- Noviyanty, Yuska., et al. 2020. Identifikasi dan Penetapan Kadar Senyawa Tanin pada Ekstrak Daun Biduri (*Calotropis gigantea*) Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. Vol 6, No 1.
- Oroian, M., & Escriche, I. 2015. Antioxidant: Characterization, Natural Sources, Extraction and Analysis. *Food Research International*. Vol 1, No 3.
- Pacier, Callen and Danik M. Martirosyan. 2015. Vitamin C: Optimal Dosages, Supplementation and Use In Disease Prevention. *Review Journal Funtional Foods in Health and Disease*; 5(3)
- Pakaya, David. 2014. Peranan Vitamin C pada Kulit. *Jurnal Ilmiah Kedokteran*. Vol.1 No.2.
- Pangkahila, W. I. 2011. *Anti Aging Medicine: Memperlambat Penuaan, Meningkatkan Kualitas Hidup*, 2nd ed. Jakarta: Penerbit Buku Kompas
- Prabowo, A.Y.T. Estiasih, I. Purwatiningrum. 2014. Umbi Gembili (*Dioscorea esculenta L.*) sebagai Bahan Pangan Mengandung Senyawa Bioaktif. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2(3)
- Priambodo, S. 1995. *Pengendalian Tikus Terpadu Seri PHT*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Purawisastra, Suryana dan Emma Sahara. 2011. Penyerapan Formaldehid oleh Beberapa Jenis Bahan Makanan serta Penghilangannya Melalui Perendaman Air Panas. *PGM*. Volume 34, Nomor 1.

- Rachman, Saadah Diana., *et al.* 2017. Alga Merah (*Gracilaria coronopifolia*) sebagai Sumber Fitohormon Sitokinin yang Potensial. *Chimica et Natura Acta*. Vol 5, No 3.
- Rahmani, Arshad Husain, *et al.* 2017. Active Constituts of Pomegranates (*Punica granatum*) as Potential Candidates in the Management of Health Through Modulation of Biological Activities. *Pharmacognosy Journal*. Vol 9, No 5.
- Rahmatullah, Irfan. 2016. *Bulan Dibuak Penuh Cinta Dibuai Penuh Harap*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*. Vol 9, No. 2. Pontianak: Polteknik Negeri Pontianak.
- Regan S, Phil G, John L, Yee L, Frank A, Arun D. 2018. Granulosa Cell Apoptosis in the Ovarian Follicle. *Front Endocrinol*. 9: 61
- Rejeki, Purwo S., Eka Arum C.P., Rizka Eka P., 2018. *Ovariectomi pada Tikus dan Mencit*. Surabaya : Airlangga University Press.
- Resti, Prima Vina., Sri Utami. Arsyad. 2020. Antioxidant Activity Potential of Red Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel as Herbal Tea. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*. Vol 20, No 2.
- Rintafiani. 2014. Siklus Estrus pada Mencit (*Mus musculus* L). *Jurnal Perkembangan Hewan*. 1-4
- Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas). 2013. *Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI*. <http://www.depkes.go.id/resources/download/general/hasil/riskesdas2013.pdf>. Diakses pada tanggal 30 Januari 2021
- Rubiyanto, D. 2017. *Metode Kromatografi Prinsip Dasar, Praktikum dan Pendekatan Pembelajaran Kromatografi*. Yogyakarta: Deepublish.
- Saito, Y., K. Nishio, Y. Yoshida, and E. Niki. 2005. Cytotoxic Effect of Formaldehyde with Free Radicals Via Increment of Cellular Reactive Oxygen Species. *Toxicology*. 210(2-3): 235-245.
- Salamah, *et al.* 2017. Pengaruh Metode Penyarian Terhadap Kadar Alkaloid Total Daun Jembirit (*Tabernaemontana sphaerocarpa* BL) dengan Metode Spektrofotometri Visibel. *Pharmaciana*. Volume. 07. Nomor. 01.
- Sayuti, Kusuma, Rina. 2015. *Antioksidan Alamidan Sintetik*. Padang: Andalas University Press
- Seeram, *et al.* 2005. In Vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicallagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal nutr biochem*; 16 (6) : 360-367

- Semiring, B. 2007. *Teknologi Penyiapan Simplisia Terstandar Tanaman Obat*. Bogor: Balai Penelitian Tanaman Obat Balitro.
- Setiawan, Dalimarta. 2008. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 5*. Jakarta: Pustaka Bunda
- Setiyono, Awik; Hendy Hendarto; Budi Prasetyo; Margarita M. Maramis. 2015. Pengaruh Tingkat Stres dan Kadar Kortisol dengan Jumlah Folikel Dominan pada Penderita Infertilitas yang Menjalani Fertilisasi Invitro. *Majalah Obstetri & Ginekologi*. 23(3): 128 – 131
- Setyawati, *et al.* 2010. Efek Formalin terhadap Hasil Reproduksi, Cacat Bawaan, dan Perkembangan Skeleton Fetus Mencit (*Mus musculus*). *Skripsi*. Bali: FMIPA Universitas Udayana
- Sherwood, Laura Iee. 2011. *Fisiologi Manusia*. Jakarta : EGC.
- Siahaan, Eva R., *et al.* 2017. Krim Ekstrak Kulit Delima merah Merah (*Punica granatum*) Menghambat Peningkatan Jumlah Melanin sama Efektifnya dengan Krim Hidrokuinon pada Kulit Marmut (*Cavia porcellus*) Betina yang Dipapar Sinar UVB. *Jurnal Biomedik*. Volume 9, Nomor 1.
- Singh, P., Kesharwani, R., Keservani, P. 2017. *Antioxidants dan Vitamins: Roles in Cellular Function and Metabolism*. London: Elsevier.
- Siyoto dan Sodik. 2015. *Dasar Metodologi Penelitian Cetakan I*. Yogyakarta: Literasi Media Publishing Tambajong.
- Speroff, L., Fritz MA. 2011. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Eight Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sugiyarto, Kh. 2000. *Kimia Anorganik I, Jurdik Kimia*. Yogyakarta : FMIPA UNY.
- Suheimi, K. 2007. Fisiologi Folikulogenesis dan Ovulasi. *Makalah pada Symposium Pertemuan Ilmiah*. Jakarta.
- Susilawati, Dewi dan Vanessa Restia. 2019. Hubungan Obesitas dan Siklus Menstruasi dengan Kejadian Infertilitas pada Pasangan Usia Subur di Klinik Dr. Hj. Putri Sri Lasmini SpOG (K) Periode Januari-Juli Tahun 2017. *Jurnal Kesehatan Mercusuar*. Vol 2, No 1.
- Syahmani., *et al.* 2017. Penggunaan Kitin Sebagai Alternatif Fase Diam Kromatografi Lapis Tipis dalam Praktikum Kimia Organik. *Jurnal Vidya Karya*. Volume 32, Nomor 1.
- Syukriani, Yoni Fuadah. 2000. *Efek Pemberian Vitamin C Berbagai Dosis Pada Profil Kadar Methemoglobin Polisi Yang Bertugas di Area Lampu Lalu Lintas*. Bandung : Universitas Padjajaran
- Takeuchi, *et al.* 2017. Total Synthesis of Ellagitannins via Sequential Site-Selective Functionalization of Unprotected D-Glucose. *The Pharmaceutical Society of Japan*. Volume 65 Nomor 1.

- Tangdiongga, Rita R., *et al.* 2015. Kajian Analisis Kimia Formaldehida Dalam Peralatan Makan Melamin Secara Spektrofotometri Sinar Tampak. *J. Ilmu dan Teknologi Pangan*. Vol 3, No 1.
- Teng, S., Beard K., Pourahmad J., *et al.* 2001. The Formaldehyde Metabolic Detoxification Enzyme Systems and Molecular Cytotoxic Mechanism in Isolated Rat Hepatocytes. *Chem Biol Interact*. Vol 1, No3.
- Thompson, E. B, 1985. *Drugs bioscreening fundamental of drug, evaluation technique in pharmacology*. New York: Granceway Pubising.
- Titin, *et al.* 2015. The Polyphenolics and Health Effects of Pomegranate. *Sains Medika*. Volume. 06. Nomor. 01.
- Tolistiawaty, Intan., *et al.* 2014. Gambaran Kesehatan pada Mencit (*Mus musculus*) di Instalasi Hewan Coba. *Jurnal Vektor Penyakit*. Volume. 8, Nomor 1.
- Triwani. 2013. *Faktor Genetik Sebagai Salah Satu Penyebab Infertilitas Pria*. Palembang: Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya.
- Tulpule, Ketki., *et al.* 2013. Formaldehyde Metabolism and Formaldehyde-Induced Stimulation of Lactate Production and Glutathione Export in Culture Neurons. *Journal of Neurochemistry*. Vol 125.
- Tyastirin, Esti dan Irul Hidayati. 2017. *Statistik Parametrik untuk Penelitian Kesehatan*. Surabaya: Program Studi Arsitektur UIN Sunan Ampel.
- Unitly, Adrien Jems Akiles. 2011. The Effect of Administration Ethanol Extract Kebar's Grass (*Biophytum petersianum* Klotzsch) on Increase the Number of Follicles. In Ovaries of Rats That Exposed to Cigarette Smoke. *Biofaal Journal*. Vol 1, No. 2.
- Widiatmoko, Ardian., *et al.* 2016. Kandungan Vitamin C, Vitamin A dan Alpha Hydroxy Acid dalam Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*). *Traditional Medicine Journal*. Volume 21, No 1.
- Wijaya, Hendra dan Lukman Junaidi. 2011. Antioksidan: Mekanisme Kerja dan Fungsi dalam Tubuh Manusia. *Journal of Agro-Based Industry*. Vol 28, No 2
- Winarsi, Hery.2011. *Antioksidan Alami dan Radikal Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius
- Wonorahardjo, Surjani. 2013. *Metode-Metode Pemisahan Kimia*. Jakarta: Akademia
- Wulandari, Lestyo. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT Taman Kampus Perindo.
- Yang DZ., Yang W., Li Y., He Z. 2013. Progress in Understanding Human Ovarian Folliculogenesis and its Implication in Assisted Reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetic*. Volume 30 : 2013-2019

LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan Dosis

	Mencit 20 gr	Tikus 200 gr	Marmot 400 gr	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 gr	1.0	7.0	12.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
Tikus 200 gr	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
Marmot 400 gr	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
Kelinci 1,5 kg	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.4	4.5	14.2
Kucing 2 kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13.0
Kera 4 kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
Anjing 12 kg	0.008	0.06	0.1	0.22	0.24	0.52	1.0	3.1
Manusia 70 kg	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.076	0.16	0.32	1.0

Tabel Konversi Perhitungan Dosis (Laurence & Bacharach, 1964)

Jenis hewan dan BB	Cara pemberian dan volume maksimum dalam milliliter				
	i.v	i.m	i.p	s.c	p.o
Mencit (20-30 g)	0,5	0,05	1,0	0,5-1,0	1,0
Tikus (100 g)	1,0	0,1	2,0-5,0	2,0-5,0	5,0
Hamster (50 g)	-	0,1	1,0-5,0	2,5	2,5
Marmot (250 g)	-	0,25	2,0-5,0	5,0	10,0
Merpati (300 g)	2,0	0,5	2,0	2,0	10,0
Kelinci (2,5 kg)	5,0-10,0	0,5	10,0-20,0	5,0-10,0	20,0
Kucing (3 kg)	5,0-10,0	1,0	10,0-20,0	5,0-10,0	50,0
Anjing (5 kg)	10,0-20,0	5,0	20,0-50,00	10,0	100,0

Tabel Volume Maksimum Pemberian pada Hewan Coba

Keterangan :

- BB = bobot badan
- i.v = Intra Vena
- i.m = Intra Muscular
- i.p = Intra Peritoneal
- s.c = Sub Kutan
- p.o = Per Oral

1. Formaldehid (Kontrol Negatif)

Menurut penelitian Setyawati (2010), yang menggunakan dosis formalin bertingkat 140 mg/kgBB/hari, 210 mg/kgBB/hari, 280 mg/kgBB/hari pada mencit untuk mengamati perkembangan fetus, didapatkan hasil pada dosis terendah 140 mg/kgBB/hari sudah menyebabkan bobot fetus berkurang dan ukurannya lebih pendek apabila dibandingkan kelompok control yang tidak diberi paparan formalin. Didukung dengan penelitian Anggraini (2017), formaldehid dosis 140 mg/kgBB/hari pada mencit dapat menyebabkan jumlah folikel mencit betina menurun. Sehingga pada penelitian ini dipilih dosis tersebut.

- Dosis acuan 140 mg/kgBB/hari pada mencit

- Dosis untuk mencit 20 gram

$$= \frac{20 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 140 \text{ mg}$$

$$= 2,8 \text{ mg/ 20 grBB mencit}$$

$$= 0,14 \text{ mg/grBB mencit}$$

- Volume pemberian/20grBB mencit

- Volume pemberian sebesar 0,2 ml/20grBB mencit

- Kebutuhan formalin untuk 5 kelompok perlakuan (30 ekor mencit)

$$= 2,8 \text{ mg} \times 30 \text{ ekor mencit}$$

$$= 84 \text{ mg}$$

- Pembuatan larutan formalin untuk 5 kelompok perlakuan 84 mg

formalin, akan dilarutkan dengan 6 ml aquades (6 ml didapat dari volume pemberian tiap mencit 0,2 ml x 30 ekor mencit)

2. Vitamin C (Kontrol Positif)

Menurut Syukriani (2000), Vitamin C sebagai antioksidan dapat memberikan efek langsung dalam menurunkan kadar methemoglobin (metHb) darah dengan dosis yang paling optimum adalah 500 mg. Didukung dengan penelitian Pacier (2015), menyarankan konsumsi Vitamin C pada rentang 60-500 mg tiap hari untuk mendapat efek paling optimal. Serta bioavailabilitas maksimum Vitamin C juga pada dosis 500 mg.

- Konversi dosis vitamin C pada mencit 20 gram
 - = $500 \text{ mg} \times 0,0026$
 - = 1,3 mg/20 gr BB mencit
 - = 0,065 mg/gr BB mencit
- Kebutuhan 1 kelompok perlakuan (5 ekor mencit)
 - = $1,3 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor mencit}$
 - = 6,5 mg
- Volume pemberian/20 gramBB mencit
 - = 0,2 ml (sekali sonde)

3. Ekstrak Delima merah

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Anggraini (2017), mengenai uji antioksidan ekstrak buah delima merah merah pada mencit yang dipapar formaldehid dengan parameter pengamatan yakni penurunan caspase-3 dan folikulogenesis system reproduksi dengan dosis bertingkat, hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis optimum antioksidan pada mencit adalah 200 mg/kg BB manusia.

Dosis $\frac{1}{2}n = 100 \text{ mg/kg BB}$ (Kelompok perlakuan 1)

Dosis $n = 200 \text{ mg/kgBB}$ (Kelompok perlakuan 2)

Dosis $2n = 400 \text{ mg/kgBB}$ (kelompok perlakuan 3)

Dalam pembuatan ekstrak ini, diberikan volume pemberian 0,2 ml/20 gram BB mencit. Pelarut yang digunakan aquades, dan suspensi yang digunakan untuk memudahkan larutnya ekstrak yakni CMC Na 0,1%.

- Konversi Dosis pada Mencit

a) Kelompok 1

= 100 mg/kgBB manusia

= 100 mg x 70 kg

= 7000 mg/70 kgBB manusia

Mencit 20 gram

= 7000 mg x 0,0026

= 18,2 mg/ 20 grBB mencit

= 0,91 mg/ grBB mencit

18,2 mg dalam 0,2 ml (dengan kandungan CMC Na 0,1%)

910 mg dalam 10 ml (dengan kandungan CMC Na 0,1%)

(untuk memudahkan pembuatan larutan dengan volume 10 ml)

b) Kelompok 2

= 200 mg/kgBB manusia

= 200 mg x 70 kg

$$= 14000 \text{ mg}/70\text{kgBB manusia}$$

Mencit 20 gram

$$= 14000 \text{ mg} \times 0,0026$$

$$= 36,4 \text{ mg}/20 \text{ gr BB mencit}$$

$$= 1,82 \text{ mg}/\text{grBB mencit}$$

36,4 mg dalam 0,2 ml (dengan kandungan CMC Na 0,1%)

1820 mg dalam 10 ml (dengan kandungan CMC Na 0,1%)

(untuk memudahkan pembuatan larutan dengan volume 10 ml)

c) Kelompok 3

$$= 400 \text{ mg}/\text{kgBB manusia}$$

$$= 400 \text{ mg} \times 70 \text{ kg}$$

$$= 28000 \text{ mg}/70 \text{ kgBB manusia}$$

Mencit 20 gram

$$= 28000 \times 0,0026$$

$$= 72,8 \text{ mg} / 20 \text{ grBB mencit}$$

$$= 3,64 \text{ mg}/ \text{grBB mencit}$$

72,8 mg dalam 0,2 ml (dengan kandungan CMC Na 0,1%)

3640 mg dalam 10 ml (dengan kandungan CMC Na 0,1%)

(untuk memudahkan pembuatan larutan dengan volume 10 ml)

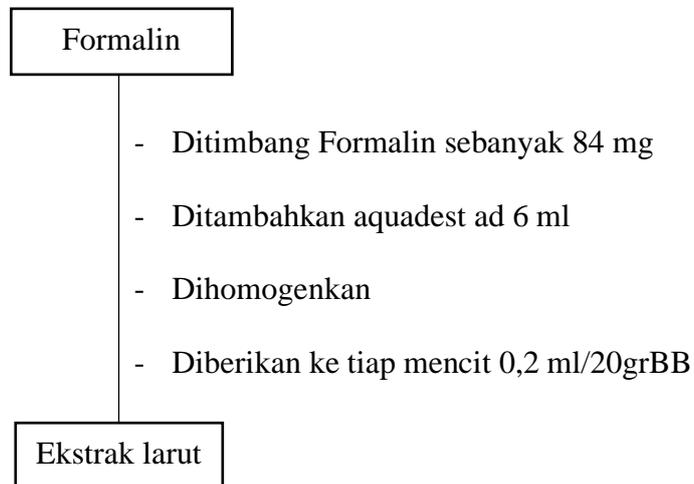
4. CMC Na 0,1%

$$\text{Konsentrasi } 0,1\% : \frac{0,1 \text{ g}}{100 \text{ ml}} : \frac{100 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} : \frac{1 \text{ mg}}{1 \text{ ml}}$$

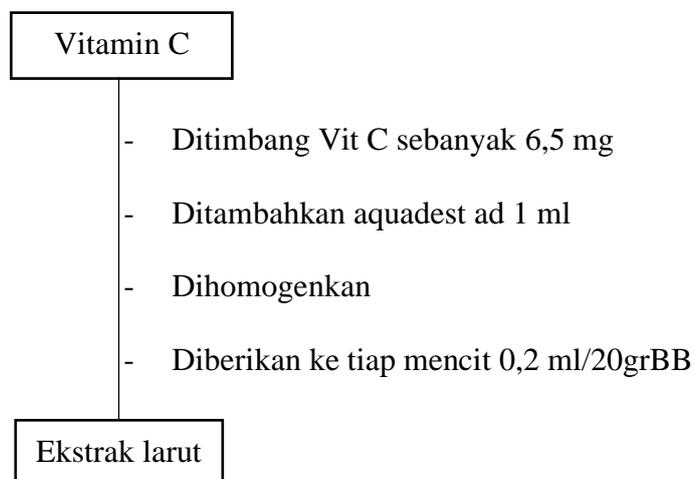
Jika ingin membuat 2 ml larutan, maka dibutuhkan 2 mg CMC Na. Namun pada perlakuan sekali sonde pada mencit volume yang diberikan yakni 0,2 ml oleh karena itu massa CMC Na yang ditimbang sebesar 0,2 mg.

Lampiran 2 Langkah Pembuatan Larutan Uji

1. Formalin



2. Vitamin C



3. Ekstrak Kental Delima merah dalam CMC Na (Perlakuan 1, 2 dan 3)

Ekstrak 10 ml

- Ditimbang CMC Na sebanyak 10 mg (konsentrasi 0,1%)
- Ditambahkan aquadest 3 ml, diaduk hingga homogen
- Ditambahkan ekstrak masing-masing sebanyak 910 mg (Perlakuan 1), 1280 mg (Perlakuan 2), 3640 mg (Perlakuan 3)
- ditambahkan aquades ad 10 ml
- Dihomogenkan

Ekstrak larut

Lampiran 3 Tabel Pengamatan Jumlah Folikel Ovarium

Folikel Primer

Kelompok	Replikasi	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	Jumlah	Total	Mean±SD
K-	1	1	-	1	2	4	14	2.8±1.304
	2	1	1	1	1	4		
	3	2	-	-	1	3		
	4	1	-	-	-	1		
	5	1	1	-	-	2		
K+	1	1	1	-	1	3	20	4.0±1.000
	2	1	3	-	1	5		
	3	2	1	-	-	3		
	4	1	1	2	-	4		
	5	3	-	2	-	5		
P1	1	1	1	1	1	4	31	6.2±1.643
	2	1	1	1	2	5		
	3	5	1	1	1	8		
	4	3	1	1	2	7		
	5	3	1	1	2	7		
P2	1	1	-	1	1	3	40	8.4±2.702
	2	4	1	-	2	7		
	3	6	2	2	-	10		
	4	2	2	2	2	8		
	5	6	1	3	2	12		
P3	1	8	5	2	-	15	55	11.0±2.915
	2	3	2	2	1	8		
	3	3	4	-	3	10		
	4	3	-	4	2	9		
	5	6	3	2	2	13		

Folikel Sekunder

Kelompok	Replikasi	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	Jumlah	Total	Mean±SD
K-	1	-	-	-	1	1	11	2.2±0.837
	2	-	-	1	1	2		
	3	-	-	1	1	2		
	4	-	1	2	-	3		
	5	1	2	-	-	3		
K+	1	1	-	-	2	3	28	5.6±3.286
	2	2	4	2	3	11		
	3	2	2	-	1	5		
	4	-	2	-	1	3		
	5	2	-	4	-	6		

P1	1	1	2	2	1	6	40	8.0±2.549
	2	1	2	4	-	6		
	3	5	2	3	2	12		
	4	1	2	3	1	7		
	5	3	2	3	1	9		
P2	1	1	1	-	1	3	41	8.2±3.421
	2	2	1	4	2	9		
	3	1	4	2	-	7		
	4	3	3	3	3	12		
	5	2	3	2	3	10		
P3	1	1	2	2	2	7	45	9.2±1.924
	2	4	4	2	2	12		
	3	2	3	1	3	9		
	4	6	1	1	2	9		
	5	3	2	1	2	8		

Folikel Tersier

Kelompok	Replikasi	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	Jumlah	Total	Mean±SD
K-	1	-	-	-	-	-	0	0
	2	-	-	-	-	-		
	3	-	-	-	-	-		
	4	-	-	-	-	-		
	5	-	-	-	-	-		
K+	1	-	-	-	-	-	1	0.2±0.447
	2	-	-	-	-	-		
	3	-	-	-	-	-		
	4	-	-	-	1	1		
	5	-	-	-	-	-		
P1	1	-	1	-	-	1	1	0.2±0.447
	2	-	-	-	-	-		
	3	-	-	-	-	-		
	4	-	-	-	-	-		
	5	-	-	-	-	-		
P2	1	-	-	1	-	1	2	0.4±0.548
	2	-	1	-	-	1		
	3	-	-	-	-	-		
	4	-	-	-	-	-		
	5	-	-	-	-	-		
P3	1	-	-	-	-	-	3	0.6±0.548
	2	-	1	-	-	1		
	3	-	-	1	-	1		
	4	-	-	-	-	-		
	5	-	-	-	1	1		

Folikel *de Graaf*

Kelompok	Replikasi	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	Jumlah	Total	Mean±SD
K-	1	-	-	-	-	-	0	0
	2	-	-	-	-	-		
	3	-	-	-	-	-		
	4	-	-	-	-	-		
	5	-	-	-	-	-		
K+	1	-	-	-	-	-	0	0
	2	-	-	-	-	-		
	3	-	-	-	-	-		
	4	-	-	-	-	-		
	5	-	-	-	-	-		
P1	1	-	-	-	-	-	1	0.2±0.447
	2	1	-	-	-	-		
	3	-	-	-	-	-		
	4	-	-	-	-	-		
	5	-	-	-	-	-		
P2	1	-	-	-	1	1	2	0.4±0.548
	2	-	-	-	-	-		
	3	-	-	-	-	-		
	4	-	-	-	-	-		
	5	-	-	1	-	1		
P3	1	-	-	1	-	1	3	0.6±0.548
	2	-	1	-	-	1		
	3	-	-	-	-	-		
	4	-	-	-	-	-		
	5	1	-	-	-	1		

Lampiran 4 Data Analisis Statistik Jumlah Folikel Ovarium

A. Folikel Primer

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Replikasi/ perlakuan	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah folikel primer	K-	.221	5	.200*	.902	5	.421
	K+	.231	5	.200*	.881	5	.314
	P1	.287	5	.200*	.914	5	.490
	P2	.234	5	.200*	.928	5	.585
	P3	.329	5	.082	.778	5	.053

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

		Levene			
		Statistic	df1	df2	Sig.
Jumlah folikel primer	Based on Mean	2.296	4	20	.095
	Based on Median	.744	4	20	.573
	Based on Median and with adjusted df	.744	4	11.040	.582
	Based on trimmed mean	1.988	4	20	.135

ANOVA

Jumlah folikel primer

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	160.640	4	40.160	9.427	.000
Within Groups	85.200	20	4.260		
Total	245.840	24			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah folikel primer

LSD

(I) Replikasi/ perlakuan	(J) Replikasi/ perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-1.40000	1.30537	.296	-4.1230	1.3230
	P1	-3.40000*	1.30537	.017	-6.1230	-.6770
	P2	-4.20000*	1.30537	.004	-6.9230	-1.4770
	P3	-7.40000*	1.30537	.000	-10.1230	-4.6770
K+	K-	1.40000	1.30537	.296	-1.3230	4.1230
	P1	-2.00000	1.30537	.141	-4.7230	.7230
	P2	-2.80000*	1.30537	.044	-5.5230	-.0770
	P3	-6.00000*	1.30537	.000	-8.7230	-3.2770
P1	K-	3.40000*	1.30537	.017	.6770	6.1230
	K+	2.00000	1.30537	.141	-.7230	4.7230
	P2	-.80000	1.30537	.547	-3.5230	1.9230
	P3	-4.00000*	1.30537	.006	-6.7230	-1.2770
P2	K-	4.20000*	1.30537	.004	1.4770	6.9230
	K+	2.80000*	1.30537	.044	.0770	5.5230
	P1	.80000	1.30537	.547	-1.9230	3.5230
	P3	-3.20000*	1.30537	.024	-5.9230	-.4770
P3	K-	7.40000*	1.30537	.000	4.6770	10.1230
	K+	6.00000*	1.30537	.000	3.2770	8.7230
	P1	4.00000*	1.30537	.006	1.2770	6.7230
	P2	3.20000*	1.30537	.024	.4770	5.9230

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

B. Folikel Sekunder

Tests of Normality

	Replikasi/ perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah folikel sekunder	K-	.231	5	.200 *	.881	5	.314
	K+	.252	5	.200 *	.845	5	.179
	P1	.253	5	.200 *	.854	5	.207

P2	.192	5	.200	.961	5	.814
P3	.141	5	.200	.979	5	.928

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

		Levene			
		Statistic	df1	df2	Sig.
Jumlah folikel sekunder	Based on Mean	1.423	4	20	.263
	Based on Median	.810	4	20	.533
	Based on Median and with adjusted df	.810	4	14.144	.539
	Based on trimmed mean	1.322	4	20	.296

ANOVA

Jumlah folikel sekunder

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	158.160	4	39.540	5.919	.003
Within Groups	133.600	20	6.680		
Total	291.760	24			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah folikel sekunder

LSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
Replikasi/ perlakuan	Replikasi/ perlakuan				Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-3.40000	1.63463	.051	-6.8098	.0098
	P1	-5.80000*	1.63463	.002	-9.2098	-2.3902
	P2	-6.00000*	1.63463	.002	-9.4098	-2.5902
	P3	-7.00000*	1.63463	.000	-10.4098	-3.5902
K+	K-	3.40000	1.63463	.051	-.0098	6.8098

	P1	-2.40000	1.63463	.158	-5.8098	1.0098
	P2	-2.60000	1.63463	.127	-6.0098	.8098
	P3	-3.60000*	1.63463	.040	-7.0098	-.1902
P1	K-	5.80000*	1.63463	.002	2.3902	9.2098
	K+	2.40000	1.63463	.158	-1.0098	5.8098
	P2	-.20000	1.63463	.904	-3.6098	3.2098
	P3	-1.20000	1.63463	.471	-4.6098	2.2098
P2	K-	6.00000*	1.63463	.002	2.5902	9.4098
	K+	2.60000	1.63463	.127	-.8098	6.0098
	P1	.20000	1.63463	.904	-3.2098	3.6098
	P3	-1.00000	1.63463	.548	-4.4098	2.4098
P3	K-	7.00000*	1.63463	.000	3.5902	10.4098
	K+	3.60000*	1.63463	.040	.1902	7.0098
	P1	1.20000	1.63463	.471	-2.2098	4.6098
	P2	1.00000	1.63463	.548	-2.4098	4.4098

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

C. Folikel Tersier

Tests of Normality

	Replikasi/ perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah foliikel tersier	K-	.	5	.	.	5	.
	K+	.473	5	.001	.552	5	.000
	P1	.473	5	.001	.552	5	.000
	P2	.367	5	.026	.684	5	.006
	P3	.367	5	.026	.684	5	.006

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

		Levene			
		Statistic	df1	df2	Sig.
Jumlah foliikel tersier	Based on Mean	5.714	4	20	.003
	Based on Median	.700	4	20	.601
	Based on Median and with adjusted df	.700	4	15.385	.604
	Based on trimmed mean	4.598	4	20	.009

Transform_tersier**Transform_tersier_y**

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Transform_tersier	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Transform	1.00	.	5	.	.	5	.
_tersier_y	1.41	.473	5	.001	.552	5	.000
	1.73	.473	5	.001	.552	5	.000
	2.00	.367	5	.026	.684	5	.006
	2.24	.367	5	.026	.684	5	.006

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Wallis Test**Test Statistics^{a,b}**

Jumlah foliikel tersier	
Kruskal-Wallis H	4.952
Df	4
Asymp. Sig.	.292

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Replikasi/perlakuan

D. Folikel de Graaf

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Replikasi/ perlakuan	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah folikel de graaf	K-	.	5	.	.	5	.
	K+	.	5	.	.	5	.
	P1	.473	5	.001	.552	5	.000
	P2	.367	5	.026	.684	5	.006
	P3	.367	5	.026	.684	5	.006

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

		Levene			
		Statistic	df1	df2	Sig.
Jumlah folikel de graaf	Based on Mean	15.333	4	20	.000
	Based on Median	1.250	4	20	.322
	Based on Median and with adjusted df	1.250	4	11.636	.343
	Based on trimmed mean	12.195	4	20	.000

Transform_degraaf

Transform_degraaf_y

Tests of Normality

	Transform_de graaf	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Transform_de	1.00	.	5	.	.	5	.
graaf_y	1.41	.	5	.	.	5	.
	1.73	.473	5	.001	.552	5	.000
	2.00	.367	5	.026	.684	5	.006
	2.24	.367	5	.026	.684	5	.006

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Wallis Test

Test Statistics^{a,b}

Jumlah folikel de graaf	
Kruskal-Wallis H	7.158
df	4
Asymp. Sig.	.128

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Replikasi/perlakuan

Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian

No	Perlakuan	Gambar
1.	Penambahan pelarut etanol 70% sebanyak 1,5 liter kedalam toples kaca berisi 500 gram serbuk delima	
2.	Dilakukan proses ekstraksi maserasi dengan pengadukan setiap 1x24 jam selama 3 hari	
3.	Dilakukan penyaringan antar filtrat dan residu	
4.	Filtrat dievaporasi dengan rotary evaporator	
5.	Ekstrak dioven selama 2 hari dengan suhu 40 derajat celcius hingga didapat ekstrak kental	

6.	Didapatkan ekstrak kental buah delima	
7.	Pembuatan larutan formaldehid untuk masing-masing kelompok perlakuan	
8.	Pembuatan larutan vitamin C dan ekstrak buah delima untuk masing-masing kelompok perlakuan	
9.	Aklimatisasi hewan coba selama 7 hari	
10.	Pemberian perlakuan pada mencit	

11.	Pengapusan swab vagina mencit	
12.	Pengamatan preparat fase proestrus	
13.	Pembedahan dan pengambilan organ lambung mencit	
14.	Organ dibersihkan dari sisa makanan/kotoran dengan NaCl dan difiksasi dalam formalin 10% selama 7 jam	
15.	Proses pembuatan preparat histologi	

16.	Proses scan preparat histologi	
-----	--------------------------------	--

Lampiran 6 Determinasi Tanaman



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No 87 Telp. (0341) 593396, e-mail: materiamedicabatu@jatimprov.go.id
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/601A/102.7/2020
 Sifat : Biasa
 Perihal : **Determinasi Tanaman Delima Merah**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : MEILINA RATNA D. S.Kep., NS., M.Kep
 NIP : 19820523 200912 2 001
 Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
 UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

1. Perihal determinasi tanaman delima merah

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 Kelas : Dicotyledonae
 Bangsa : Myrtales
 Suku : Punicaceae
 Marga : Puniceae
 Jenis : *Punica granatum* L.
 Sinonim : *Malum granatum* Rumph.
 Nama Daerah : Glima (Aceh), glimeu mekah (Gayo), dalimo (Batak), gangsalan (Jawa), dalima (Sunda), dhalima (Madura), jeliman (Sasak), talima (Bima), dila dac lok (Roti), lelo kase, rumau (Timor), dilimene (Kisar).

Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-16a-239b-243b-244b-248b-249b-250a-251b-253b-254b-255b-256b-261a-262b-263b-264a-1.

2. Morfologi : Habitus: Perdu, tinggi 2-5 m. Batang: Berkayu, bulat, bercabang, berduri, masih muda coklat setelah tua hijau kotor. Daun: Tunggal, bentuk lanset, tepi rata, ujung runcing, pangkal tumpul, panjang 1-8 cm, lebar 5-15 mm, pertulangan menyirip, permukaan mengkilat, hijau. Bunga: Tunggal, di ujung cabang, tangkai pendek, kelopak berlekatan, merah atau kuning pucat, mahkota membulat, tangkai sari melengkung, kuning, putik putih, merah atau kuning. Buah: Dinding luarnya liat, keras atau kaku, hampir seperti kayu; dinding dalam tipis, liat, bersekat-sekat; masing-masing ruang dengan banyak biji; selaput biji tebal berair dan dapat dimakan, berwarna merah. Biji: Bulat, keras, kecil, merah. Akar: Tunggang, kuning kecoklatan.
3. Bagian yang digunakan : Kulit, buah, biji.
 4. Penggunaan : Penelitian.
 5. Daftar Pustaka
- Syamsuhideyat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia 1*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
 - Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 28 Desember 2020

KEPALA UPT LABORATORIUM HERBAL
 MATERIA MEDICA BATU



ACHMAD MABRUR, SKM, M.Kes.
 PEMBINA
 NIP. 19680203 199203 1 004

Lampiran 7 Ethical Clearance

	FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN Kampus 3 FKIK Gedung Ibnu Thufail lantai 2 Jalan Locari, Tekung Kota Batu E-mail: kepk.fkik@uin-malang.ac.id - Website : http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id
	KETERANGAN KELAIKAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE) No. 021/EC/KEPK-FKIK/2021

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN(KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG TELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN :

Judul	Efektifitas Ekstrak Daun Cengkeh (<i>Syzygium aromaticum L</i>) dan Buah Delima Merah (<i>Punica granatum L</i>) terhadap Histopatologi Mencit Dan Penyembuhan Luka Bakar
Sub Judul	Efektifitas Ekstrak Daun Cengkeh (<i>Syzygium aromaticum L</i>) dan Buah Delima Merah (<i>Punica granatum L</i>) terhadap Histopatologi Mencit Dan Penyembuhan Luka Bakar
Peneliti	- Meilina Ratna Dianti, S.Kep.,NS.,M.Kep - Adhin Muiza Keswanti - Ivana Ifadayanti - Suci Anugra Heny - Alya Bunga Kirana - Eka Laeli Agustin - Arien Alvi Fathoniyah - Pratiwiek Nanda Trisanti - Ikrimah Nur Alawiyah
Unit / Lembaga	Program Studi Pendidikan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Tempat Penelitian	laboratorium FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN TERSEBUT TELAH MEMENUHI SYARAT ATAU LAIK ETIK.

Malang, 5 April 2021


 Dr. Dedy Indrawan, MMRS
 NIP. 19781001201701011113

Keterangan :

- Keterangan Laik Etik Ini berlaku 1 (satu) tahun sejak tanggal dikeluarkan.
- Pada akhir penelitian, laporan Pelaksanaan Penelitian harus diserahkan kepada KEPK-FKIK dalam bentuk *soft copy*.
- Apabila ada perubahan protokol dan/atau Perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).