

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian uji aktivitas laktagogum ini adalah daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) yang diperoleh dari petani budidaya ubi jalar ungu di Kecamatan Tawangmangu, Karanganyar.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dengan memilih daun yang segar, bebas dari hama, dan berwarna hijau yang diambil dari populasi secara acak di petani budidaya ubi jalar ungu daerah Tawangmangu, Karanganyar pada Bulan Januari 2023.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dalam 3 variasi dosis.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah produksi air susu induk tikus dalam masa laktasi dengan parameter penambahan berat badan anak tikus dan histopatologi kelenjar *mammae*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasikan menjadi beberapa jenis, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang dapat diubah guna mengetahui pengaruh terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah 3 variasi dosis ekstrak etanol daun ubi jalar ungu yang diberikan secara *oral* pada tikus.

Variabel tergantung adalah inti permasalahan dalam penelitian yang jika dihubungkan dengan variabel bebas akan memberikan respon. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek laktagogum terhadap peningkatan berat badan pada anakan tikus dan histologi kelenjar *mammae* setelah diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu.

Variabel terkontrol adalah variabel yang memiliki pengaruh terhadap variabel tergantung akibatnya harus memenuhi kriteria tertentu agar temuannya dapat diandalkan dan dapat diulangi oleh peneliti lain. Waktu panen, masa aklimatisasi, ketepatan dosis,

ketepatan penyiapan simplisia, keadaan laboratorium, kondisi fisik hewan uji meliputi bobot badan, umur, jenis kelamin, dan galur merupakan variabel terkendali dalam penelitian ini.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun ubi jalar ungu segar adalah daun ubi jalar segar yang diperoleh dari petani ubi jalar ungu di daerah Tawangmangu, Karanganyar pada Bulan Januari 2023.

Kedua, serbuk daun ubi jalar ungu adalah hasil penyerbukan dari daun ubi ungu yang telah melalui proses pengeringan dengan oven pada suhu 50°C, digiling, dan diayak dengan ayakan mesh no. 60.

Ketiga, ekstrak etanol daun ubi jalar ungu adalah hasil ekstraksi serbuk daun ubi jalar ungu menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi, kemudian dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental daun ubi jalar ungu.

Keempat, hewan uji yang digunakan adalah tikus betina berusia 2-3 bulan dengan berat antara 200 sampai 300 gram dalam masa laktasi.

Kelima, laktagogum adalah zat yang dapat membantu meningkatkan laju produksi air susu.

Keenam, peningkatan berat badan anakan tikus adalah parameter pengukuran peningkatan produksi air susu induk tikus dengan menghitung rata-rata kenaikan berat badan anakan tikus sebelum dan sesudah menyusui selama 14 hari.

Ketujuh, histologi kelenjar *mammae* adalah parameter pengukuran peningkatan produksi air susu induk tikus yang dilihat dari jumlah dan diameter alveoli.

Kedelapan, dosis efektif adalah dosis terkecil yang berbeda signifikan dengan kontrol negatif dan sebanding dengan kontrol positif..

C. Bahan, Alat, dan Hewan Uji

1. Bahan

1.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* (L.)), tikus putih galur wistar berjenis kelamin betina, pakan tikus, sekam.

1.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70% sebagai larutan penyari. Lancar ASI® sebagai kontrol positif yang diproduksi oleh PT. Mucosin Indonesia,

CMC-Na 0,5% sebagai kontrol negatif, dan kontrol normal yang menggunakan pakan (pellet) serta minum (air). Bahan untuk pengamatan histologi adalah formalin, *hematoxylin eosin*, etanol, *xylene*, parafin, dan alkohol. Bahan uji kandungan kimia senyawa tanaman adalah, aquadest, serbuk magnesium, HCl pekat, HCl 2N, NaCl, FeCl₃ 1%, pereaksi mayer, pereaksi wagner, pereaksi dragendrof, etanol, dan lieberman burchard.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam proses pembuatan simplisia kering, serbuk bahan ekstrak, dan ekstrak adalah pisau, oven, loyang, wadah penampung, *toothed disc mill*, ayakan nomor 60, neraca analitik, gelas beker, batang pengaduk, labu ukur, pipet volume, pipet tetes, kertas saring, tabung reaksi, corong gelas, botol vial, dan *rotary evaporator*.

Alat yang digunakan pada proses perlakuan terhadap hewan uji adalah timbangan tikus, sonde oral, *scalpel*, pipet tetes, kandang tikus, masker dan sarung tangan.

Alat yang digunakan selama proses pembedahan dan pengambilan kelenjar *mammae* adalah seperangkat alat bedah, mikroskop trinokuler, *object glass*, *deck glass*, botol dehidrasi, botol fiksasi, kain kasa, *tissue processor*, *rotary microtom*, pisau set mikrotom, *block embedding*, alat potong beku, *waterbath*, pemanas, *cooling plate*, dan alat pewarna jaringan.

3. Hewan Uji

3.1. Induk tikus. Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor induk tikus betina putih galur wistar yang siap bereproduksi, berumur 2-3 bulan dengan berat rata-rata 200-300 gram. Penentuan jumlah hewan uji ditentukan berdasarkan rumus Federer sebagai berikut:

Rumus Federer : $(n-1) \times (t-1) \geq 15$

Keterangan : n = jumlah sampel tiap kelompok
t = jumlah kelompok

Banyaknya kelompok : 6 kelompok (t)

Sampel tiap kelompok : $(n-1) \times (t-1) \geq 15$

$(n-1) \times (6-1) \geq 15$

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

$5n - 5 \geq 15$

n $\geq (15 + 5)/5$

n ≥ 4

Hasil perhitungan menggunakan rumus Federer jumlah tikus yang didapatkan adalah 4 ekor perkelompok. Selama penelitian kemungkinan tikus mengalami sakit ataupun kematian cukup besar sehingga jumlah sampel setiap kelompok ditambah satu ekor dan jumlah keseluruhan menjadi 5 ekor tiap kelompok.

Tikus yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta, dimana semua tikus sebelum diperlakukan akan mendapatkan diet dan ditempatkan di kandang yang sesuai ukuran dan *temperature* $30\pm 10^{\circ}\text{C}$.

3.2. Anakan tikus. Jumlah anakan tikus yang akan diamati adalah semua kelahiran yang dilahirkan induk tikus.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman ubi jalar ungu

Determinasi tanaman dilakukan dengan menentukan keabsahan sampel yang digunakan terkait dengan ciri – ciri morfologi tanaman ubi jalar ungu. Hal tersebut dilakukan untuk memastikan kebenaran tanaman, agar tidak terjadi kesalahan saat pengambilan bahan dan untuk menghindari bahan tercampur dengan simplisia lain. Penelitian ini menggunakan sampel tanaman ubi jalar ungu yang akan dilakukan determinasi di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan dan pembuatan serbuk daun ubi jalar ungu

Sampel penelitian yang digunakan yaitu daun ubi jalar ungu yang diperoleh dari petani budidaya ubi jalar ungu Kecamatan Tawangmangu, Karanganyar. Daun ubi jalar ungu diperoleh dalam keadaan baik dan segar dilakukan penyortiran basah dan dicuci bersih untuk menghilangkan kotoran dan debu yang menempel. Daun ubi jalar yang sudah dicuci kemudian dilakukan perajangan dan dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C . Sortasi kering dilakukan setelahnya dengan memisahkan bagian yang tidak dibutuhkan. Proses terakhir dilakukan penghalusan dengan blender lalu diayak dengan ayakan *mesh* nomor 60. Simplisia yang sudah diayak kemudian disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya dan kering.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun ubi jalar ungu

Penetapan susut pengeringan serbuk daun ubi jalar menggunakan alat *moisture balance*. Sampel serbuk ditimbang

sebanyak 2 gram dan dimasukkan di atas plat lempeng kemudian dimasukkan dalam *moisture balance*. Pengoperasian alat tersebut selesai apabila telah mencapai kesetimbangan kelembaban yang ditandai dengan *moisture balance* berbunyi beberapa kali. Penetapan susut pengeringan serbuk dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Hasil penetapan susut pengeringan dituliskan dalam satuan persen (%) (DepKes RI, 2000).

4. Penetapan kadar air serbuk

Penentuan kadar air serbuk daun ubi jalar ungu menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Sampel serbuk daun ubi jalar ungu ditimbang sebanyak 20 gram, dimasukkan ke dalam labu alas bulat pada rangkaian alat *Sterling Bidwell*, tambahkan 200 mililiter *toluene* jenuh air, panaskan hingga tidak menetes lagi. Kadar air diukur sebagai volume air setelah pemisahan sempurna antara air dan *toluene* dan dihitung dalam % v/b (KemenKes RI, 2017).

5. Pembuatan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu

Pembuatan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dilakukan dengan metode maserasi menggunakan perbandingan 1:10. Botol berwarna gelap berisi 600 gram serbuk daun ubi jalar ungu kemudian diisi dengan 6.000 ml etanol 70%, sesekali dikocok, dan didiamkan selama 24 jam tanpa terkena cahaya. Hasil maserasi disaring dengan kain flanel dan kertas saring. Ampas yang didapatkan kemudian dibilas kembali dengan pelarut yang sama dengan jumlah volume pelarutnya 3.000 ml, ditutup dan didiamkan selama 18 jam terlindung dari cahaya, dengan penggojokan sesekali. Maserat kemudian dikumpulkan dan dipisahkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, hasilnya disebut ekstrak kental etanol daun ubi jalar ungu (KemenKes, 2017). Skema proses pembuatan ekstrak daun ubi jalar ungu dapat dilihat pada gambar 2.

6. Penetapan organoleptis

Penetapan organoleptis serbuk dan ekstrak daun ubi jalar ungu dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, dan bau dari ekstrak daun ubi jalar ungu.

7. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun ubi jalar ungu

Penetapan susut pengeringan ekstrak daun ubi jalar ungu menggunakan alat *moisture balance*. Sampel ekstrak ditimbang sebanyak 2 gram dan dimasukkan di atas plat lempeng kemudian dimasukkan dalam *moisture balance*. Pengoperasian alat tersebut

selesai apabila telah mencapai kesetimbangan kelembaban yang ditandai dengan *moisture balance* berbunyi beberapa kali. Penetapan susut pengeringan serbuk dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Hasil penetapan susut pengeringan dituliskan dalam satuan persen (%) (DepKes RI, 2000).

8. Penetapan kadar air ekstrak

Penentuan kadar air ekstrak daun ubi jalar ungu menggunakan metode gravimetri. Sampel ditimbang sebanyak 10 g, kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang telah ditara. Sampel dimasukkan ke dalam oven yang telah diatur pada suhu 105° selama 5 jam, dan ditimbang. Proses diulangi dengan selang waktu 1 jam dan ditimbang sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (KemenKes RI 2017).

9. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak

Identifikasi kandungan kimia yang ada di dalam daun ubi jalar ungu menggunakan sampel berupa serbuk simplisia daun ubi jalar ungu dan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu. Identifikasi kandungan kimia dilakukan guna mengetahui kebenaran kandungan kimia yang terkandung didalamnya. Identifikasi menggunakan metode tabung.

9.1. Pembuatan larutan uji. Larutan uji untuk serbuk dibuat dengan cara melarutkan serbuk daun ubi jalar ungu dengan air dengan pemanasan kemudian disaring. Larutan uji untuk ekstrak dibuat dengan cara melarutkan ekstrak kental daun ubi jalar ungu dengan sedikit etanol 70% dan ditambahkan aquadest kemudian disaring.

9.2. Identifikasi flavonoid. 2 ml larutan uji ditambahkan dengan serbuk magnesium dan HCl pekat. Munculnya warna merah merupakan tanda adanya flavonoid (Lidyawati *et al.*, 2021).

9.3. Identifikasi saponin. 10 ml larutan uji dikocok kuat-kuat dan ditambah dengan HCL 2N. Terbentuknya busa merupakan tanda adanya saponin (Lidyawati *et al.*, 2021).

9.4. Identifikasi alkaloid. 5 ml larutan uji, HCl 2N, NaCl ditambahkan dalam tabung reaksi. Tiga tabung dengan penambahan terpisah reagen *mayer*, *wagner*, dan *dragendorff* dibuat dari fraksi asam. Penambahan pereaksi Mayer menghasilkan pembentukan endapan putih, penambahan pereaksi *wagner* menghasilkan pembentukan endapan coklat, dan penambahan pereaksi *dragendorff* menghasilkan pembentukan endapan merah jingga (Lidyawati *et al.*, 2021).

9.5. Identifikasi tanin. 5 ml larutan uji ditambahkan dengan larutan FeCl_3 1% (b/v). Larutan uji akan berubah warna menjadi biru tua, biru-hitam, atau hijau-hitam jika terdapat senyawa tanin (Lidyawati *et al.*, 2021).

9.6. Identifikasi steroid & terpenoid. 5 ml larutan uji dipanaskan pada temperatur cawan porselen diatas *water bath*, disaring, dan diperoleh filtratnya. Filtrat dilarutkan dengan kloroform kemudian ditambah dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Pembentukan warna merah atau ungu merupakan tanda adanya terpenoid dan pembentukan warna hijau merupakan tanda adanya steroid (Lidyawati *et al.*, 2021).

10. Pembuatan larutan kontrol positif

Suspensi Lancar ASI® dibuat dengan cara menggerus 1 kaplet Lancar ASI® yang memiliki kandungan zat aktif sebanyak 200 mg lalu disuspensikan dengan CMC Na 0,5% hingga volume 100 ml.

11. Pembuatan larutan uji CMC Na 0,5%

Larutan CMC Na 0,5% dibuat dengan cara melarutkan 0,5 gram CMC Na dengan air suling hangat sedikit demi sedikit, lalu dihaluskan hingga menjadi campuran yang homogen di dalam mortir yang sudah dipanaskan sebelumnya. ditambahkan air suling hingga 100 ml aduk ad homogen. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 16.

12. Penentuan dosis

12.1. Penentuan dosis kontrol positif. Penggunaan dosis Lancar ASI® sekali pakai yaitu 200 mg/ 70kg BB manusia. Faktor konversi dari manusia ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018. Perhitungan dosis Lancar ASI® untuk tikus 200 gram adalah $200 \text{ mg} \times 0,018 = 3,6 \text{ mg}/200 \text{ gram BB tikus}$ (18 mg/kg BB tikus), perhitungan dapat dilihat pada lampiran 16.

12.2. Penentuan dosis ekstrak daun ubi jalar ungu. Dosis ekstrak daun ubi jalar didapatkan berdasarkan dosis empiris yaitu 200 gram simplisia basah/ 70kg BB manusia. Dosis empiris dikonversi menjadi dosis ekstrak untuk manusia dengan berat 70 kg dengan cara dikalikan dengan rendemen bobot kering dan rendemen ekstrak yaitu $200 \text{ gram} \times 10\% \times 17,5\% = 3,5 \text{ gram}/70 \text{ kg BB manusia}$. Dosis ekstrak pada manusia dikonversi ke tikus dengan berat 200 gram yaitu $3,5 \text{ gram} \times 0,018 = 0,063 \text{ g}/200\text{g BB tikus}$ (315mg/kg BB tikus). Dosis tersebut dibuat 3 perlakuan yang berbeda yaitu 315; 630; 1260 mg/kg BB tikus. Berdasarkan berat badan induk tikus, besar volume pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu yang diberikan secara

oral dihitung, kemudian dilarutkan dengan larutan suspensi CMC Na 0,5%, perhitungan dapat dilihat pada lampiran 16.

13. Penyiapan hewan uji

30 ekor tikus betina yang digunakan sebagai subjek percobaan pada penelitian ini berumur antara 2 sampai 3 bulan dan mempunyai berat badan 200 sampai 300 gram pada masa laktasi. Hewan percobaan dipelihara dalam kandang dengan diberi makan (*pellet*) dan minum (air) 3x sehari (saran: perlu dilakukan orientasi pemberian pakan, penimbangan pemberian pakan, dan sisa pakan). Hewan uji menjalani adaptasi selama 7 hari agar terbiasa dengan kondisi percobaan dan mampu mengatur kesehatannya. Enam kelompok tikus dibagi secara acak. Lima ekor tikus dari masing-masing kelompok mendapat perlakuan sebagai berikut:

Kelompok I : Kelompok kontrol normal tanpa dilakukan perlakuan, hanya diberikan pakan dan minum.

Kelompok II : Kelompok kontrol negatif diberikan suspensi CMC Na 0,5%

Kelompok III : Kelompok kontrol positif diberikan Lancar asi® dengan dosis 18 mg/kg BB tikus.

Kelompok IV : Kelompok perlakuan pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan 315 mg/kg BB tikus.

Kelompok V : Kelompok perlakuan pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan 630 mg/kg BB tikus.

Kelompok VI : Kelompok perlakuan pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan 1260 mg/kg BB tikus.

14. Pengukuran peningkatan berat badan anakan tikus

Sediaan uji diberikan secara oral sehari sekali pada induk tikus pada masa laktasi yaitu selama 14 hari. Pengambilan data berat badan anakan tikus dilakukan dengan cara menimbang anakan tikus setiap hari selama 14 hari sebelum dan sesudah tikus meminum air susu induk. Penimbangan pertama dilakukan pada pagi hari (W1) lalu induk tikus diberi perlakuan secara oral, penimbangan anakan tikus kedua pada siang hari setelah anakan tikus dipisahkan dari induknya selama 4 jam (W2). Anakan tikus kemudian digabungkan kembali bersama induknya untuk proses laktasi selama 1 jam dan ditimbang kembali setelah 2 jam (W3). Rata-rata kenaikan berat badan harian anak tikus di dapat dengan rumus $[(W3-W2)+(W2-W1)]/4$ (Ferdian dan Wijayahadi, 2018).

15. Penyiapan preparat histologi

Pertama, hewan uji yaitu induk tikus dikorbankan dengan cara perusakan otak lewat leher/ *decapitation* dan dibedah, kemudian diambil kelenjar *mammae* pada lokasi yang sama yaitu inguinal. Kedua, kelenjar *mammae* dilakukan tahap fiksasi dengan menggunakan formalin 10%. Ketiga, tahap dehidrasi dilakukan dengan alkohol dengan konsentrasi bertingkat. Keempat, tahap *clearing* menggunakan larutan *xylene* atau *xylol*. Kelima, tahap *embedding*/pembenaman Tahap ini dilakukan dengan paraffin. Keenam, tahap blocking/ pengecoran adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dilakukan tahap pemotongan dengan mikrotom. Ketujuh, tahap *mounting*/pemotongan dilakukan dengan mikrotom. Kedelapan, tahap *staining*/ pewarnaan yang diawali dengan deparafinisasi menggunakan *xylene*. Jaringan yang telah dilakukan deparafinisasi dilakukan hidrasi dengan alkohol. Tahap selanjutnya adalah jaringan diinkubasi dalam larutan *hematoxylin* selama 5-10 menit. Selanjutnya, jaringan dicuci dalam air mengalir dan dilanjutkan dengan pewarnaan dengan *eosin* selama 1-2 menit kemudian dicuci di bawah air mengalir. Kesembilan, Tahap rehidrasi untuk menarik air dari jaringan agar tidak cepat rusak dan awet menggunakan alkohol. Tahap selanjutnya jaringan direndam dengan *xylene* selama 2 menit dengan 2 kali replikasi dan dilakukan *mounting*, yaitu penutupan sediaan dengan galatin sebagai perekat dan ditutup dengan *deck glass*.

16. Pemeriksaan histologi

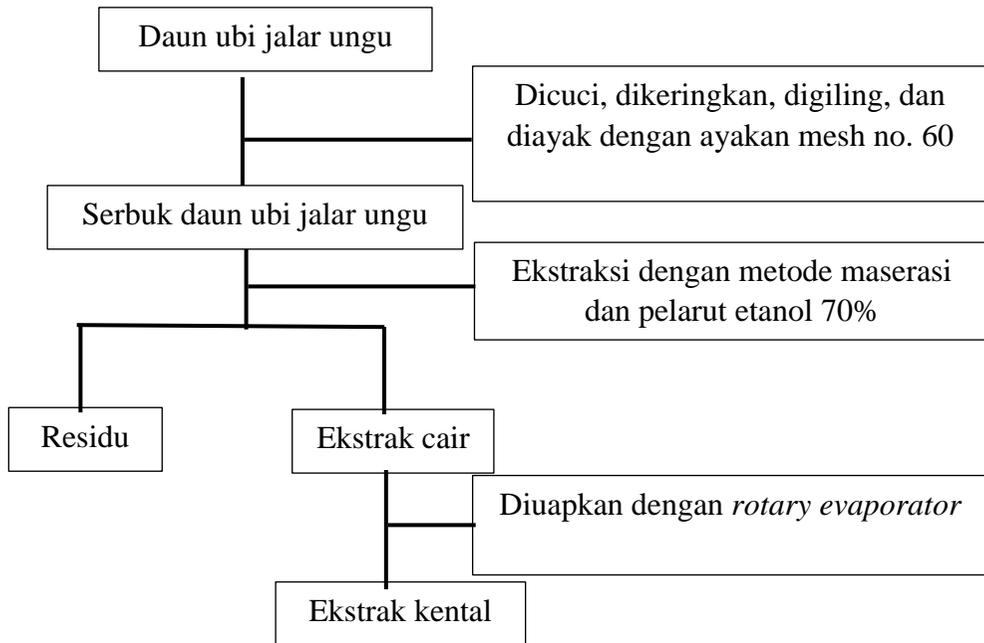
Sampel preparat histologi dibaca menggunakan mikroskop perbesaran 400x. Data yang akan diperoleh adalah jumlah dan diameter alveoli. Perhitungan jumlah alveoli dilakukan dengan memeriksa 3 lapang pandang mikroskop setiap preparat. Pengukuran diameter alveoli dilakukan dengan bantuan mikroruler dengan memeriksa 3 buah alveoli pada 1 lapang pandang mikroskop setiap preparat.

E. Analisis Hasil

Data yang diperoleh dari penelitian ini yaitu peningkatan berat badan anakan tikus dan gambaran histologi kelenjar *mammae* induk tikus dianalisa menggunakan SPSS versi 21 dengan uji normalitas *Shapiro wilk* untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak. Data dilanjutkan dengan analisis parametrik menggunakan *Analysis of Varians* (ANOVA) jika memenuhi persyaratan ($p > 0.05$)

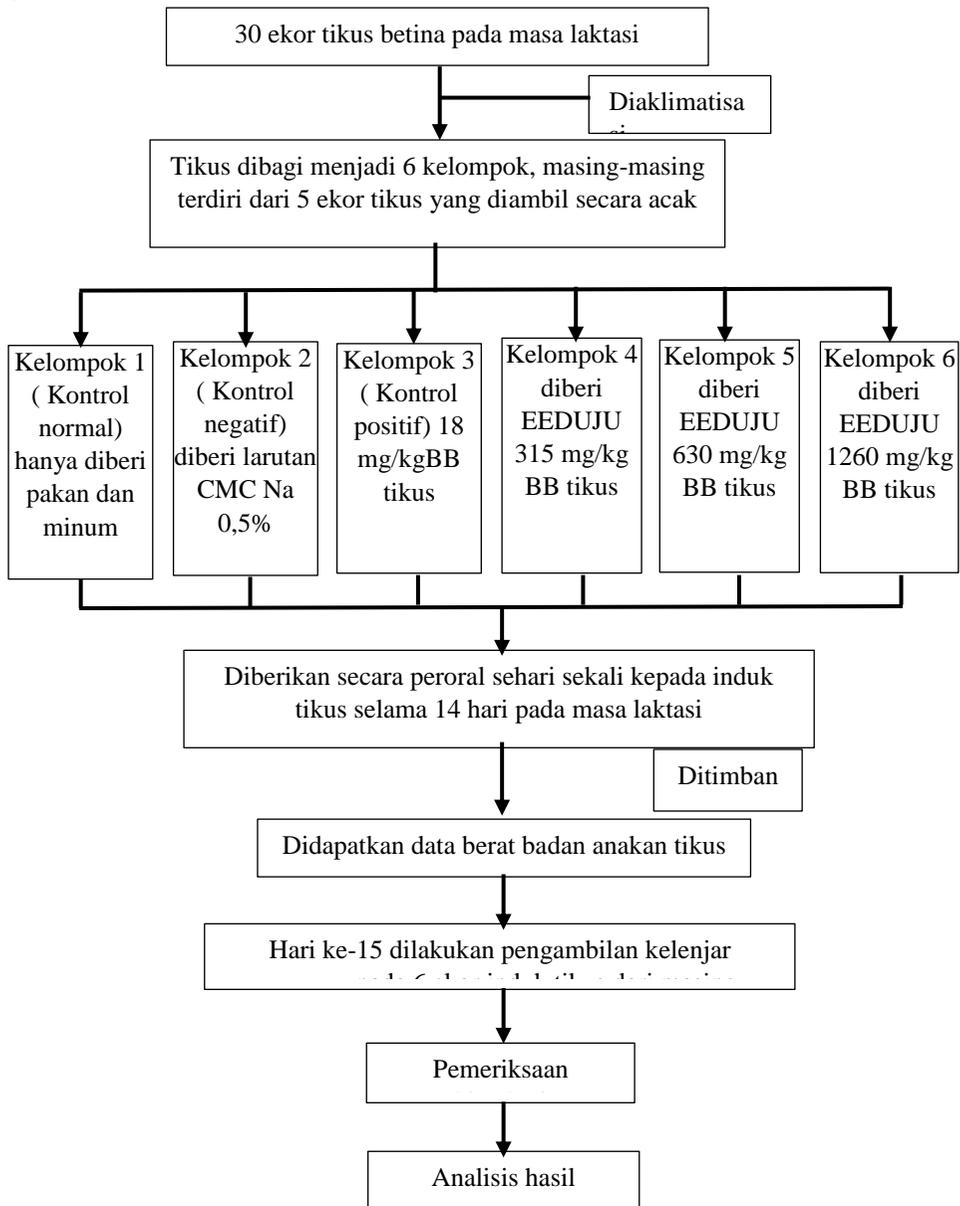
dan dilanjutkan dengan analisis *Tukey Post Hoc Test* untuk melihat apakah ada perbedaan antar kelompok perlakuan dengan taraf kepercayaan 95%.

F. Skema Penelitian



Gambar 6. Skema pembuatan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu

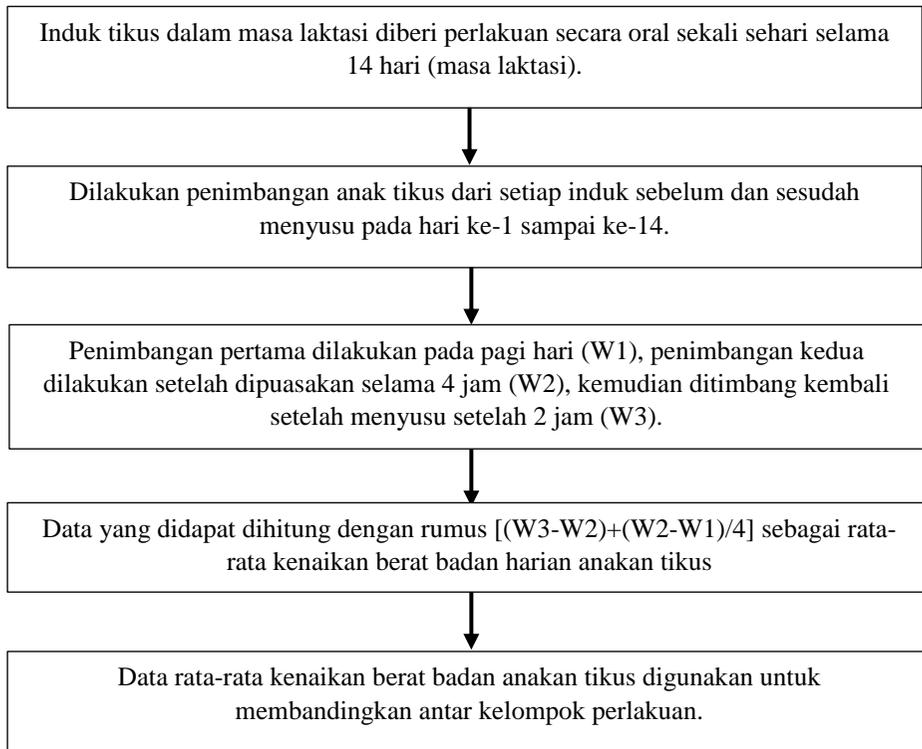
Alur penelitian ini melalui beberapa tahapan yang dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Skema alur penelitian

Keterangan :

EEDUJU : Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu

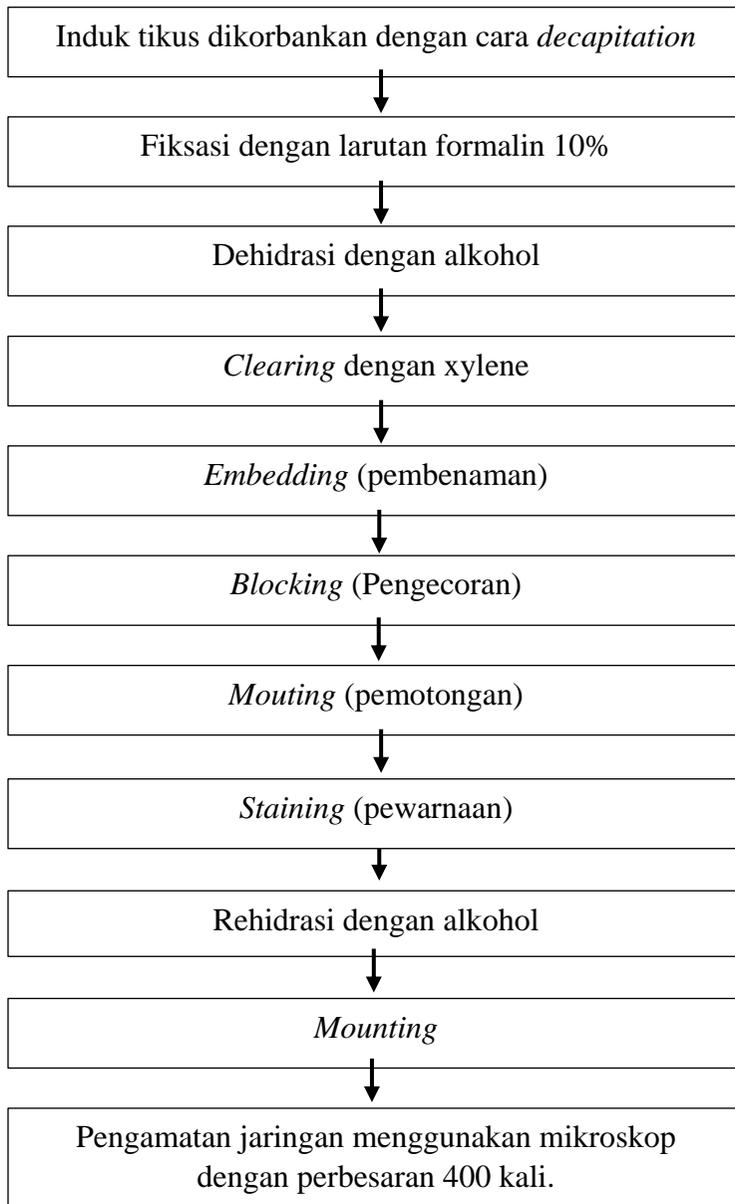


Gambar 8. Skema prosedur pengukuran berat badan anakan tikus

Keterangan :

W : waktu

G. Alur Pemeriksaan Histologi



Gambar 9. Skema alur pemeriksaan histologi kelenjar *mammae*.