

BAB III METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Universitas Gadjah Mada. Determinasi tanaman daun kelor dan daun kemuning di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu. Histopatologi sel islet pankreas akan dilakukan di Laboratorium Universitas Sebelas Maret Surakarta. Pengukuran kadar glukosa, kadar SOD dan GPx akan dilakukan di Laboratorium Universitas Gadjah Mada.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Oktober 2021 sampai Maret 2022. Determinasi tanaman dilaksanakan pada bulan Oktober 2021. Pengeringan simplisia dilakukan pada bulan Oktober 2021. Pembuatan ekstrak dilakukan pada bulan Oktober 2021-November 2021. Perlakuan hewan uji dilakukan pada bulan November 2021-Januari 2022. Pengumpulan dan analisis data dilakukan pada bulan Februari 2022-Maret 2022.

B. Populasi dan Sampel

Populasi tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) dan daun kelor (*Moringa oleifera* L.) yang diperoleh dari CV. Herbal Anugrah Alam daerah Kabupaten Bantul, Yogyakarta.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) dan daun kelor (*Moringa oleifera* L.) segar dengan daun berwarna hijau yang diperoleh dari CV. Herbal Anugrah Alam daerah Kabupaten Bantul, Yogyakarta.

C. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Identifikasi variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung.

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah aktivitas antidiabetes kombinasi ekstrak etanol daun kemuning dan ekstrak etanol daun kelor.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah adalah antioksidan kombinasi ekstrak etanol daun kemuning dan ekstrak etanol daun kelor pada kadar SOD dan GPx.

.Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah adalah antioksidan kombinasi ekstrak etanol daun kemuning dan ekstrak etanol daun kelor dilihat dari gambaran histopatologi sel islet pankreas.

2. Klasifikasi variabel

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel kendali dan variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel kendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu untuk ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lainnya secara tepat. Variabel tergantung merupakan titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian ini.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah kombinasi ekstrak etanol dari daun kemuning dan daun kelor dengan variasi dosis ekstrak daun kemuning dan daun kelor 76,5 mg/200 g BB tikus : 6,5 mg/200 g BB tikus (50% : 50%), 114,75 mg/200 g BB tikus : 3,25 mg/200 g BB tikus (75% : 25%) dan 38,25 mg/200 g BB tikus 9,75 mg/200 g BB tikus (25% : 75%).

Variabel tergantung pada penelitian ini yang pertama, adalah aktivitas antidiabetes pada tikus yang diinduksi STZ-NA yang dipengaruhi oleh kombinasi ekstrak etanol daun kemuning dan daun kelor dengan melihat penurunan kadar glukosa darah tikus sebelum dan sesudah perlakuan. Kedua, aktivitas antioksidan pada penurunan stres oksidatif dengan melihat nilai SOD dan GPx yang dipengaruhi oleh kombinasi ekstrak daun kemuning dan daun kelor pada hewan uji. Ketiga aktivitas antioksidan pada penurunan stres oksidatif dengan melihat gambaran histopatologi sel islet pankreas yang dipengaruhi oleh kombinasi ekstrak daun kemuning dan daun kelor pada hewan uji.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah pengambilan simplisia, pengeringan simplisia, lama pengeringan, suhu pengeringan, suhu pemekatan ekstrak, penginduksi diabetes, dosis pemberian, lama perlakuan, dan umur tikus.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kemuning adalah daun kemuning segar berwarna hijau yang diperoleh dari CV. Herbal Anugrah Alam daerah Kabupaten Bantul, Yogyakarta.

Kedua, daun kelor adalah daun kelor segar berwarna hijau yang diperoleh dari CV. Herbal Anugrah Alam daerah Kabupaten Bantul, Yogyakarta.

Ketiga, serbuk daun kemuning dan daun kelor adalah tanaman yang sudah dikeringkan dengan oven pada suhu 40° C kemudian diblender menjadi serbuk halus dan diayak dengan pengayak no 40.

Keempat, ekstrak etanol daun kemuning dan daun kelor adalah hasil ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 5 hari dan direndam lagi selama 5 hari menggunakan pelarut yang sama, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

Kelima, hewan uji adalah tikus putih jantan galur wistar yang diperoleh dari Laboratorium Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

Keenam, penginduksian diabetes mellitus adalah penginduksian tikus secara intraperitoneal dengan menginjeksi STZ 45 mg/Kg dan Nikotinamid 110 mg/Kg BB secara intraperitoneal pada tikus.

Ketujuh, pengukuran kadar gula darah adalah pengambilan sampel darah tikus. Sebelum melakukan pengambilan darah, tikus terlebih dahulu dilakukan uji coba prosedur pengambilan darah tikus.

Kedelapan, pengukuran kadar SOD dan GPx adalah pengambilan supernatan hati tikus yang telah dikorbakan, lalu diukur kadar SOD dan GPx.

Kesembilan, penilaian gambaran histopatologi pada sel islet pankreas adalah pengamatan jaringan sel islet pankreas dengan pewarnaan *Hematoksilin- Eosin* (HE).

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan pembuatan ekstrak, terdiri dari alat pemotong, blender, ayakan 40 , neraca analitik (GF 3000). Peralatan untuk uji identifikasi senyawa kimia terdiri plat KLT (GF 254), chamber, pipa kapiler, *beaker glass*, gelas ukur, blender, erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, pipet tetes, autoclave, labu destilasi, kertas saring, botol

coklat, water bath, kain flanel, *rotary vacuum evaporator* dan alat *Moisture Balance*. Spektrofotometer, centrifuge dan mikroskop.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemuning dan daun kelor segar berwarna hijau yang diperoleh dari CV. Herbal Anugrah Alam daerah Kabupaten Bantul, Yogyakarta dan dimaserasi menggunakan etanol 96%. Bahan induksi diabetes menggunakan STZ-NA, larutan CMC 1 %, glibenklamide sebagai kontrol positif, pereaksi uji aktivitas enzim SOD dan GPx, *Glucose Oxidase Phenol Aminoanti-pyrine*, buffer fosfat 50 mM (pH 7,4) yang mengandung inhibitor protease, 0,2 mM PMSF, 1 mM EDTA bufer natrium karbonat 50 mM yang mengandung 0,1 mM EDTA (pH 10), 0,06 ml xantin 10 mM, 0,03 ml *bovine serum albumin* (BSA) 0,5%, 0,03 ml NET 2,5 mM, xantin oksidase (0,04 unit), 200 µl glutation tereduksi (GSH), 10 mM, 200 µl enzim glutation reduktase (2,4 unit), 200 µl NADPH 1,5 mM, formalin 10%, dan bahan pengecatan *Hematoxylin Eosin*. Hewan uji tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) diperoleh dari Laboratorium Bahan Pangan Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta sebanyak 30 ekor yang berumur 6-8 minggu dengan bobot badan berkisar antara 200-250 g.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar berumur 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram yang berasal dari Laboratorium Bahan Pangan Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta sebanyak 30 ekor.

E. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi tanaman

Tahap awal dilakukan identifikasi tanaman kemuning dan kelor yang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret Surakarta. Determinasi dilakukan untuk memastikan bahwa tanaman yang diperiksa dalam penelitian ini sesuai dengan tanaman yang dimaksud untuk menghindari kesalahan pada pemilihan bahan tanaman tersebut dengan penetapan kebenaran tentang tanaman kemuning dan kelor yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman kemuning dan kelor berdasarkan kepustakaan untuk menghindari kesalahan.

2. Pembuatan serbuk

2.1 Pembuatan serbuk daun kemuning. Daun kemuning dicuci bersih pada air mengalir agar terbebas dari kotoran dan debu, kemudian dikeringkan dalam oven 40° C dan diserbuk, yang bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama (Voight, 1994). Serbuk jintan hitam kemudian diayak dengan ayakan nomor 40.

2.2 Pembuatan serbuk daun kelor. Daun kelor dicuci bersih pada air mengalir agar terbebas dari kotoran dan debu, kemudian dikeringkan dalam oven 40° C dan diserbuk, yang bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama (Voight, 1994). Serbuk jintan hitam kemudian diayak dengan ayakan nomor 40.

3. Penetapan kadar air serbuk

Pada penelitian ini menggunakan cara destilasi toluen, yaitu serbuk sebanyak 5 gram ditimbang seksama dan dimasukkan ke dalam labu. Kemudian dimasukkan lebih kurang 200 ml toluen ke dalam labu dan alat dihubungkan, kemudian dipanaskan. Setelah toluen mendidih atur penyulingan dengan kecepatan 2 tetes perdetik, hingga sebagian besar air tersuling. Dinginkan tabung penerima hingga suhu ruang. Jika ada tetes air yang melekat, gosok tabung pendingin dan tabung penerima dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen jenuh air hingga tetes air turun. Baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna dan dihitung kadar air dalam % v/b (FHI, 2017).

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{Kerapatan Ekstrak}}{\text{Kerapatan Air}} \times 100\%$$

4. Pembuatan ekstrak etanol daun kemuning dan daun kelor

Masing-masing serbuk daun kemuning dan daun kelor sebanyak 500 gram dalam keadaan kering direndam dengan pelarut etanol 96% sebanyak 5000 ml dengan perbandingan 500 gram serbuk: 5000 ml pelarut etanol 96% (1:10). Masing-masing serbuk daun kemuning dan daun kelor yang telah direndam dalam pelarut etanol 96 % selama 6 jam pertama dengan sesekali digojok, kemudian didiamkan selama 18 jam. Kemudian serbuk daun kemuning dan daun kelor dipisahkan dengan filtrasi menggunakan kain flannel. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Kumpulkan semua maserat, kemudian diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* hingga didapat ekstrak

etanol kental (Farmakope Herbal Indonesia, 2017).

5. Identifikasi kimia ekstrak daun kemuning dan daun kelor

5.1 Uji flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada KLT kemudian dielusi dengan eluen *n* – heksan : etil asetat (8:2). Setelah elusi selesai lempeng disemprot dengan penyemprot Sitroborat. Hasil positif menunjukkan warna kuning pada sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm (Wagner *et al.*, 1984).

5.2 Uji tannin. Identifikasi menggunakan metode KLT yang disemprot dengan pereaksi bercak tertentu. Identifikasi Tanin dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada lempeng KLT kemudian dielusi dengan eluen *n*-heksan : etil asetat (8:2). Setelah elusi selesai, lempeng disemprot dengan penyemprot FeCl₃ 10%. Hasil positif menunjukkan warna hijau kehitaman pada sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm (Wagner *et al.*, 1984).

5.3 Uji Alkaloid. Identifikasi Alkaloid dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada KLT kemudian dielusi dengan eluen etil asetat : metanol : air (16:1:2). Setelah elusi selesai lempeng disemprot dengan penyemprot Dragendorff. Hasil positif menunjukkan warna jingga pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm (DepKes RI, 1989).

5.4 Uji Kumarin. Identifikasi kumarin dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada KLT kemudian dielusi dengan toluen-*p* : etil asetat (7:3). Hasil positif menunjukkan warna biru berflouresensi pada sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm (FHI, 2017)

6. Penetapan dosis

6.1. Pembuatan suspensi CMC-Na (CMC-Na 1 %). Suspensi CMC-Na 1 % dibuat dengan cara menimbang 1 g CMC-Na dimasukkan kedalam 100 ml air suling sambil dipanaskan dan diaduk, ditunggu sampai jernih dan tidak ada gumpalan. Kemudian ditambahkan air suling sampai volume 100 ml.

6.2. Perhitungan dosis kontrol positif. Kontrol positif menggunakan glibenklamide dengan dosis 5 mg/Kg BB manusia diberikan tiga kali sehari. Kemudian dikonversikan pada tikus jantan galur wistar dengan berat 200 g yaitu 0,018. Sehingga dosis yang diberikan pada tikus jantan galur wistar adalah $5 \times 0,018 = 0,09/200g$ BB tikus jantan galur wistar. Pemberian tablet glibenklamide kepada

tikus dengan cara, tablet glibenklamide digerus terlebih dahulu kemudian dimasukkan ke dalam lumpang dan ditambahkan larutan koloid Na-CMC 1 % b/v sedikit demi sedikit sambil digerus hingga homogen. Setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan larutan koloid Na-CMC 1 % hingga volume 100 ml.

6.3. Penetapan dosis ekstrak daun kemuning. Dosis ekstrak daun kemuning yang digunakan pada penelitian ini yaitu 76,5 mg/200 g BB. Ekstrak etanol daun kemuning 3.825 mg digerus terlebih dahulu kemudian dimasukkan ke dalam lumpang dan ditambahkan larutan koloid Na-CMC 1 % b/v sedikit demi sedikit sambil digerus hingga homogen. Setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan larutan koloid Na-CMC 1 % hingga volume 100 ml.

6.4. Penetapan dosis ekstrak daun kelor. Dosis ekstrak daun kelor yang digunakan pada penelitian ini yaitu 6,5 mg/200 g BB. Ekstrak etanol daun kelor 325 mg digerus terlebih dahulu kemudian dimasukkan ke dalam lumpang dan ditambahkan larutan koloid Na-CMC 1 % b/v sedikit demi sedikit sambil digerus hingga homogen. Setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan larutan koloid Na-CMC 1 % hingga volume 100 ml.

6.5. Perhitungan dosis STZ-NA. Dosis STZ-NA yang digunakan pada penelitian ini yaitu STZ 45 mg/Kg dan Nikotinamid 110 mg/Kg BB. Kemudian dikonversikan pada tikus jantan galur wistar dengan berat 200 g. Sehingga dosis yang diberikan pada tikus jantan galur wistar adalah Dosis STZ yang diberikan pada tikus adalah 9 mg/200 g BB tikus dan dosis NA adalah 22 mg/200 g BB tikus.

7. Penyiapan hewan uji

Kelompok hewan uji tikus dibagi atas 3 kelompok kontrol (normal, positif dan negatif) dan 3 kelompok sediaan ekstrak daun kemuning dan daun kelor dengan variasi dosis 76,5 mg/200 g BB tikus : 6,5 mg/200 g BB tikus (50% : 50%), 114,75 mg/200 g BB tikus : 3,25 mg/200 g BB tikus (75% : 25%) dan 38,25 mg/200 g BB tikus 9,75 mg/200 g BB tikus (25% : 75%). Tikus diadaptasikan terhadap lingkungan selama satu minggu dengan diberi pakan standar dan diperiksa kondisi kesehatannya. Hewan uji dipelihara dalam kondisi yang sama sebelum diberikan perlakuan. Pengaturan suhu dan kelembaban dari kandang harus diperhatikan karena dapat mempengaruhi uji dan hasil penelitian. Tikus yang telah diadaptasikan selama satu minggu kemudian ditimbang untuk menentukan dosis dan

dilakukan penelitian

8. Uji antidiabetes

Tikus diaklimasi selama 1 minggu, kemudian tidak diberi makan, namun tetap diberi minum selama 16-18 jam sebelum perlakuan. Berat badan ditimbang dan diukur kadar glukosa darah puasa pada hari ke-1 sebagai kadar glukosa darah awal (T_0). Setelah injeksi STZ-NA hanya pada 5 kelompok (kontrol positif, kontrol negatif, dosis I, dosis II dan dosis III) pengukuran glukosa darah dilakukan pada bagian sinus orbitalis mata dengan menggunakan metode GOD- PAP (T_1). Pengukuran kadar gula darah tikus dilakukan 3 hari setelah induksi STZ-NA, tikus yang kadar glukosa darah puasanya ≥ 200 mg/dL (13,9 mmol/dL) dianggap diabetes (Mendes *et al.*, 2012). Setelah tikus dinyatakan DM, tikus diberi perlakuan sesuai dengan kelompok uji (kontrol positif, kontrol negatif, dosis I, dosis II dan dosis III) selama 21 hari. Setiap kali melakukan pengambilan darah, tikus terlebih dahulu dipuasakan selama 8 jam.

Setelah pengukuran kadar glukosa darah, hati tikus diambil, dibersihkan, dikeringkan, dan diproses untuk uji biokimia. Sampel dihomogenkan dalam buffer fosfat 50 nM (pH 7,4) yang mengandung inhibitor protease, 0,2 mM PMSF dan 1 mM EDTA, pada suhu 4°C selama 30 detik (2-15 detik) dengan 15 detik interval pendinginan. Homogenat disaring dan filtrat disentrifuge pada 1088 gram (pada r_{max} 108 mm) selama 5 menit dalam kondisi dingin. Supernatan yang dihasilkan digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim antioksidan meliputi SOD dan GPx.

Tabel 2. Kelompok perlakuan

Kelompok	Jumlah tikus	Perlakuan
I (kontrol normal)	5	larutan suspensi (Na-CMC 1 %)
II (kontrol negatif)	5	tikus diinduksi STZ 45 mg/Kg dan Nikotinamid 110 mg/Kg BB (i.p) dan diberi Na-CMC 1% (P.O)
III (kontrol positif)	5	tikus diinduksi STZ 45 mg/Kg dan Nikotinamid 110 mg/Kg BB (i.p) dan diberikan Glibenklamide 0,09 mg/200g BB (oral)
IV (sediaan uji 1)	5	tikus diinduksi STZ 45 mg/Kg dan Nikotinamid 110 mg/Kg BB (i.p) dan 76,5 mg/200 g BB tikus : 6,5 mg/200 g BB tikus (50% : 50%) dan diberi Na-CMC 1% (P.O)

Kelompok	Jumlah tikus	Perlakuan
V (sediaan uji 2)	5	tikus diinduksi STZ 45 mg/Kg dan Nikotinamid 110 mg/Kg BB (i.p) dan 114,75 mg/200 g BB tikus : 3,25 mg/200 g BB tikus (75% : 25%) dan diberi Na-CMC 1% (P.O)
VI (sediaan uji 3)	5	tikus diinduksi STZ 45 mg/Kg dan Nikotinamid 110 mg/Kg BB (i.p) dan 38,25 mg/200 g BB tikus : 9,75 mg/200 g BB tikus (25% : 75%) dan diberi Na-CMC 1% (P.O)

9. Analisa kadar glukosa darah tikus

Pengukuran kadar gula darah dengan GOD-PAP menggunakan metode enzimatik yang umumnya menggunakan kerja enzim *glucose oksidase* atau *heksokinase* yang bereaksi dengan glukosa, tetapi tidak pada senyawa gula yang lain seperti fruktosa, galaktosa serta pada bahan pereduksi. Pengambilan sampel darah diambil melalui vena retroorbital dengan pipet hematokrit. Pengambilan darah melalui sinus orbitalis mata. Gula darah puasa yang diambil melalui mata dimasukkan ke dalam wadah lalu disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit, terbentuk dua lapisan yaitu serum dan sel darah merah. Lapisan serum dipipet 10 µl, di kocok lalu diinkubasi selama 20 menit, warna yang telah terbentuk selanjutnya dibaca dengan kolorimeter pada panjang gelombang 500 nm.

10. Pengujian antioksidan secara in vivo

10.1 Pengukuran aktivitas SOD. Aktivitas SOD diukur dengan menggunakan protokol SOD AssayKit WST (2002). Kedalam tiap tabung sampel dan blanko 2 ditambahkan 20 µL sample solution berupa sampel plasma, dan ditambahkan 20 µL H₂O untuk masing-masing tabung blanko 1 dan blanko 3. Masing-masing larutan (sampel, blanko 1, blanko 2, blanko 3) ditambahkan 200 µL WST Working Solution dan 20 µL dilution buffer untuk blanko 2 dan blanko 3. Sebanyak 20 µL Enzym Working Solution ditambahkan untuk setiap sampel dan blanko 1. Masing-masing larutan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit dan selanjutnya diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450 nm.

$$\text{Aktivitas SOD} = \frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sampel}} - A_{\text{blank2}})}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

10.2 Pengujian aktivitas GPx. Pengukuran aktivitas GPx

dilakukan menggunakan metode Lawrence (1976) yang dimodifikasi. Sebanyak 200 µl supernatan jernih hati ditambahkan 200 µl buffer fosfat 0,1 M pH 7,0 yang mengandung 0,1 mM EDTA, 200 µl glutation tereduksi (GSH) 10 mM dan 200 µl enzim glutation reduktase (2,4 unit). Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 200 µl NADPH 1,5 mM dan diinkubasi lagi selama tiga menit pada suhu yang sama, dan dilanjutkan dengan penambahan 200 µl H₂O₂ 1,5 mM. Absorbansi diukur diantara waktu satu sampai dua menit dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm.

$$M \text{ unt GSH-Px} = \frac{\text{Abs} \times V_t \times 2 \times 1000 \times \frac{1}{\text{mg}} \text{ protein}}{6,22 \times V_s}$$

Abs = perubahan absorbansi; V_t = Volume total (ml); 6,22 = Koefisien ekstrinsik dari NADPH; 2 = 2 mol GSH yang setara dengan 1 mol NADPH; 1000 = Perubahan menjadi mili unit; V_s = Volume sampel

11. Uji Histopatologi

11.1 Dehidrasi. Dilakukan proses pembedahan pada bagian *abdominothoracal* dan diambil jaringan pankreas. Jaringan dipotong dengan ketebalan 3-5 mm dan dimasukkan ke dalam plastik yang berisi formalin 10%. Proses dehidrasi menggunakan alkohol dengan variasi konsentrasi 70%, 80%, 90%. Setiap konsentrasi larutan alkohol tersebut ditempatkan pada 3 buah pot plastik masing-masing setinggi 2/3 pot plastik. Setiap pot dengan konsentrasi alkohol yang sama diberi label I, II, III untuk menandakan urutan proses dehidrasi. Tahap dehidrasi dimulai dengan memasukkan potongan pankreas ke dalam pot plastik berlabel I, II, lalu III. Potongan organ direndam selama 15 menit secara berurutan ke dalam larutan alkohol 70%, 80%, 90% dan 95%.

11.2 Clearing. Pada tahapan ini digunakan larutan toluol : alkohol (1:1) dan toluol murni. Potongan organ dimasukkan ke dalam larutan toluol : alkohol (1:1) dan direndam selama 25 menit. Kemudian potongan organ tersebut dipindahkan dan direndam ke dalam toluol murni selama 60 menit hingga menjadi bening. Perendaman dalam toluol murni diperpanjang sampai potongan menjadi bening. Waktu perendaman dalam toluol murni selama 120 menit.

11.3 Embedding. Buat larutan toluol : parafin (50 ml : 50 ml). Kemudian bungkus organ menggunakan tissue berpori lalu rendam dalam larutan tersebut dan diamkan pada suhu ruangan selama 24 jam. Setelah itu cairkan parafin dengan suhu diantara 56-62°C dan diberi label I, II, III dan IV. Masukkan potongan organ ke dalam

larutan parafin secara berurutan, masing-masingnya selama 15 menit.

11.4 Blocking. Cairkan parafin lalu tuangkan sedikit ke dalam cetakan blok. Masukkan potongan organ secara perlahan dan kemudian tuangkan kembali parafin hingga merendam organ.

11.5 Pewarnaan HE. Proses pewarnaan masukkan dan rendam cawan yang berisi preparat kedalam *staining jar* yang berisi *xylol* selama 10 menit sebanyak 2 kali. Lalu pindahkan dan rendam cawan ke dalam *staining jar* berisi alkohol absolut selama 5 menit sebanyak 2 kali. Pindahkan dan rendam cawan ke dalam *staining jar* berisi alkohol konsentrasi 90%, 80% lalu 70%, masing-masing selama 1 menit. Pindahkan cawan tersebut dan rendam ke dalam *staining jar* yang berisi Hematoksilin dengan 1 menit. Selama durasi itu dilakukan pengamatan dibawah mikroskop untuk menghindari terjadinya *overstaining* hematoksilin. Lakukan perendaman cawan di dalam *staining jar* berisi aquades sebanyak 3 kali dengan durasi 1 menit. Pindahkan dan rendam cawan ke dalam *staining jar* berisi alkohol asam selama 30 detik. Kemudian pindahkan dan rendam cawan kedalam *staining jar* yang sudah dialiri air mengalir selama 1 menit. Pindahkan dan rendam cawan ke dalam *staining jar* berisi Eosin selama 1 menit. Selama durasi itu dilakukan pengamatan dibawah mikroskop untuk menghindari terjadinya *overstaining* eosin. Lakukan pemindahan dan perendaman cawan di dalam *staining jar* berisi aquades sebanyak 3 kali dengan durasi 1 menit. Pindahkan secara berurutan dan rendam cawan ke dalam *staining jar* yang berisi alkohol dengan konsentrasi meningkat dari 70% sampai alkohol absolut selama 1 menit dan *xylol* sebanyak 2 kali 3 menit. Segera teteskan dan ratakan *canada balsam* secukupnya di atas preparat dan ditutup dengan *cover glass*. Amati di bawah mikroskop dan jangan biarkan ada gelembung udara pada preparat. Berikan nama organ/kode organ serta tanggal pembuatan. Tunggu hingga kering. Preparat siap disimpan.

11.6 Pengamatan jaringan. Preparat diamati dan difoto dengan menggunakan mikroskop Olympus BX41 dan *software* Olympus DP2-BSW yang dimulai dari perbesaran 4x, 10x, 20x, dan 40x. Jaringan diamati dan dilakukan penilaian sesuai dengan parameter

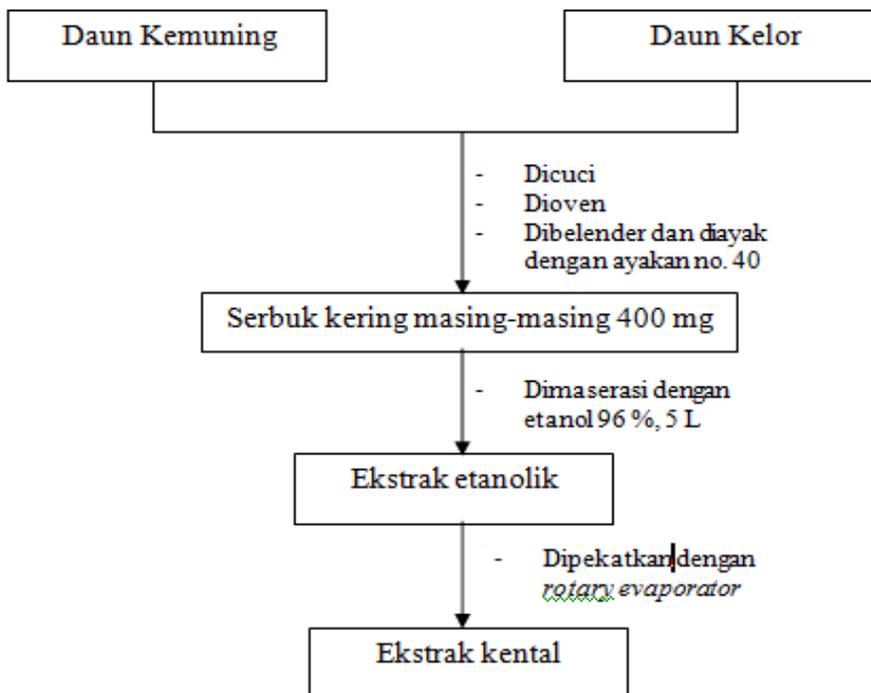
F. Analisis Data

Nilai uji histopatologi, SOD, GPx dan antidiabetes yang disertai hiperglikemia dianalisis dengan uji statistik parametrik (*Kolmogorov-*

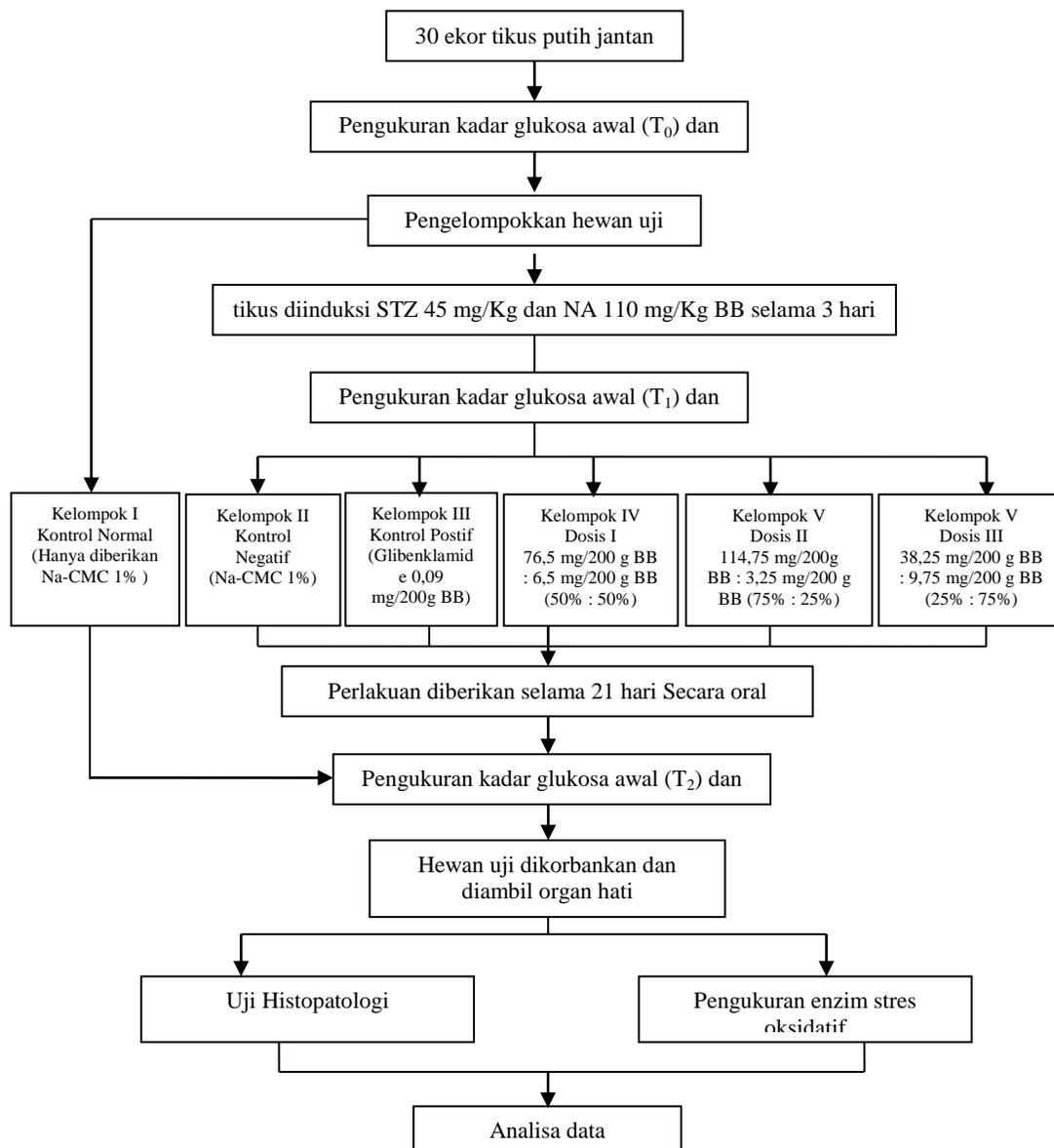
smirnov test) jika tidak terdistribusi normal dilanjutkan dengan metode non-parametrik *Kruskal-Wallis Test* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan pada semua kelompok dan dilanjutkan dengan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata antara 2 kelompok dari semua kelompok, jika terjadi perbedaan bermakna.

Jika terdistribusi normal hasil uji terdapat beda ($p > 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji parametrik (*Oneway Anova*) jika terdapat perbedaan bermakna dilakukan *uji post hoc*. Nilai-nilai yang dianggap signifikansi secara statistik ketika signifikansi nilainya kurang dari 0,05 ($p < 0,05$).

G. Skema Penelitian



Gambar 7. Pembuatan ekstrak daun kemuning dan daun kelor



Gambar 8. Skema pengujian uji aktivitas antidiabetes dan antioksidan pada tikus