

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi adalah keseluruhan obyek yang menjadi target pada penelitian. Biji kacang kedelai (*Glycine max* L.) merupakan populasi yang digunakan dalam penelitian ini.

Sampel adalah bagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel dalam penelitian ini adalah biji kedelai (*Glycine max* L.) diambil saat panen yang sudah tua dan tidak busuk. Sampel diambil dari pertanian secara acak di daerah Karanganyar, Jawa Tengah. Tanaman kedelai kemudian di determinasi di B2P2TOOT, Tawangmangu, Jawa Tengah.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol biji kedelai (*Glycine max* L.)

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah parameter berat badan induk tikus, berat badan anakan tikus, dan histologi kelenjar *mammae* induk tikus.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama dikelompokkan menjadi variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mengetahui dampaknya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi dosis ekstrak etanol biji yaitu 325 mg/kg BB tikus, 650 mg/kg BB tikus, dan 1300 mg/kg BB tikus yang diberikan secara oral.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan barometer penilaian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek dari pemberian ekstrak etanol biji kedelai terhadap berat badan induk tikus, berat badan anakan tikus, jumlah dan diameter alveoli kelenjar *mammae* induk tikus.

Variabel terkendali adalah variabel yang dapat berpengaruh terhadap variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya. Variabel terkendali penelitian ini adalah waktu panen, kesesuaian pembuatan simplisia, ketepatan dosis, kondisi laboratorium, waktu

aklitimasi, kondisi fisik hewan uji meliputi usia, berat badan, jenis kelamin, galur, makan 3x sehari, dan minum.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, biji kedelai adalah biji yang diperoleh dari tanaman kedelai yang berasal dari petani di daerah Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk biji kedelai adalah serbuk yang diperoleh dari hasil sortasi basah, pencucian, penirisan, pengeringan, penggilingan, dan pengayakan menggunakan *mesh* nomor 60.

Ketiga, ekstrak etanol biji kedelai adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% selama 3 hari kemudian memekatkan hasil penyarian menggunakan alat *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental biji kedelai.

Keempat, hewan uji yang digunakan adalah tikus betina galur Wistar berumur 2-3 bulan dengan berat badan antara 170-250 g yang siap bereproduksi.

Kelima, dosis efektif adalah dosis terkecil yang memiliki efek sebanding dengan kelompok kontrol positif.

Keenam, aktivitas *lactagogum* adalah aktivitas senyawa yang dapat meningkatkan produksi susu. Aktivitas *lactagogum* diteliti berdasarkan parameter berat badan induk, berat badan anak, dan histologi kelenjar *mammae* induk tikus. Berat badan induk adalah berat badan induk yang ditimbang selama 13 hari dengan selang waktu 2 hari dimulai dari hari pertama melahirkan. Berat badan anakan tikus adalah berat badan anak yang ditimbang setiap hari selama 14 hari. Histologi kelenjar *mammae* induk tikus adalah pengamatan terhadap alveoli *mammae* menggunakan mikroskop trinokuler dengan perbesaran 400x.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat yang dipakai dalam pembuatan simplisia kering, serbuk, ekstrak, dan skrining fitokimia ekstrak adalah sarung tangan, masker, oven, loyang, timbangan digital, mesin *grinding*, ayakan nomor 60, timbangan analitik (Ohaus<sup>®</sup>), *moisture balance* (Ohaus<sup>®</sup>), sendok tanduk, botol coklat, corong kaca (Iwaki<sup>®</sup>), corong plastik, kain flanel, kertas saring, *vacuum rotary evaporator* (Ika<sup>®</sup>), batang pengaduk, jar kaca, kaki tiga, tabung reaksi (Iwaki<sup>®</sup>), rak tabung reaksi, pipet tetes, *waterbath*, mortir, stamfer, sudip, desikator, pipet volume (Iwaki<sup>®</sup>),

erlenmeyer (Iwaki<sup>®</sup>), gelas ukur (Iwaki<sup>®</sup>), beaker glass (Iwaki<sup>®</sup>), cawan porselin.

Alat yang dipakai untuk perlakuan hewan uji adalah sarung tangan, masker, tempat minum tikus, kandang tikus, jar kaca, timbangan tikus, sonde oral, spuit *disposable*.

Alat yang dipakai saat pembedahan, pengambilan organ, dan pengamatan organ adalah seperangkat alat bedah (jarum, gunting, scalpel, pinset, dan meja lilin), botol dehidrasi, inkubator, jar kaca, pipet tetes, beaker glass, kaset embedding, base mold, alat dehidrasi otomatis (Leica TP 1020), *block imbedding* (Leica 1105), alat potong beku (Leica), *object glass*, *deck glass*, alat pewarna jaringan, mikrotom putar (*rotary microtome*), dan mikroskop trinokuler (Leica<sup>®</sup>).

Alat yang dipakai untuk analisis data dan hasil adalah alat tulis dan laptop.

## **2. Bahan**

Bahan sampel yang dipakai untuk penelitian ini adalah biji kedelai, tikus putih betina galur wistar, pakan tikus, minum tikus, dan sekam.

Bahan kimia yang dipakai untuk penelitian ini adalah etanol 70%, spiritus, serbuk Mg, HCl 2N, HCl pekat, pereaksi Mayer, pereaksi Bouchardat, pereaksi Dragendorff, FeCl<sub>3</sub>, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, tablet Lancar ASI<sup>®</sup>, aquadest, CMC Na 0,5%, etanol 80%, etanol 90%, NaCl 0,9%, formalin 10%, parafin, larutan *xylene*, pewarna *hematoxylin*, pewarna *eosin*, etanol absolut, dan gelatin.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Persetujuan etik**

*Ethical clearance* atau kelayakan etik merupakan keterangan tertulis yang diberikan oleh Komisi Etik Penelitian untuk riset yang melibatkan makhluk hidup yang menyatakan bahwa suatu proposal riset layak dilaksanakan setelah memenuhi persyaratan tertentu. Proposal penelitian diserahkan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi Surakarta.

### **2. Determinasi tanamaan kedelai**

Tanaman dideterminasi untuk memastikan keakuratan sampel tanaman yang digunakan dengan mencocokkan karakteristik mikroskopik dan makroskopik dari biji kedelai. Determinasi dilakukan agar saat pengumpulan bahan tidak terjadi kesalahan. Sampel kedelai

akan dilakukan determinasi di B2P2TOOT, Tawangmangu, Jawa Tengah.

### **3. Pengumpulan bahan**

Sampel biji kedelai yang digunakan didapat dari petani daerah Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel biji kedelai dengan karakteristik tidak rusak, tidak hancur, berwarna kuning. Biji kedelai dipilih yang masak/tua, dikupas kulit buahnya kemudian dikeluarkan bijinya.

### **4. Pembuatan serbuk biji kedelai**

Biji kedelai yang diperoleh dari petani daerah Karanganyar selanjutnya di sortasi basah untuk membersihkan dari kotoran misalnya tanah yang menempel pada sampel kemudian ditiriskan lalu dikeringkan menggunakan oven suhu 40°C. Simplisia kering kemudian dilakukan sortasi kering lalu dihaluskan menggunakan mesin *grinding* kemudian di ayak menggunakan ayakan nomor *mesh* 60.

### **5. Pembuatan ekstrak etanol biji kedelai**

Ekstrak etanol biji kedelai dibuat memakai metode maserasi perbandingannya 1:10. Serbuk biji kedelai sebanyak 600 gram dimaserasi menggunakan 6000 mL etanol 70% dalam botol kaca berwarna coklat/gelap (sebagai pengganti alat untuk meserasi), ditutup kemudian disimpan di tempat yang terlindung dari sinar cahaya. Perendaman campuran memerlukan waktu 18 jam dimana 6 jam pertama larutan di gojog. Hasil maserasi disaring memakai kain flanel kemudian kertas saring. Pengulangan penyarian paling sedikit satu kali menggunakan pelarut yang sama dengan jumlah volume pelarut ½ dari volume pelarut penyarian pertama (1:5). Ekstrak cair lalu dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga didapat ekstrak kental (Kemenkes RI, 2017).

### **6. Identifikasi serbuk dan ekstrak biji kedelai**

**6.1 Identifikasi organoleptik serbuk dan ekstrak biji kedelai.** Uji organoleptik merupakan pengenalan awal yang sederhana dan dilakukan secara objektif. Uji organoleptik dilakukan pengamatan terhadap serbuk dan ekstrak biji kedelai meliputi warna, bentuk, bau, dan rasa (Depkes RI, 2000).

**6.2 Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak biji kedelai.** Serbuk dan ekstrak biji kedelai ditentukan susut pengeringannya menggunakan *Moisture balance*. Serbuk dan ekstrak biji kedelai dimasukkan kedalam plat lempeng sebanyak 2 gram yang sebelumnya sudah ditara pada suhu 105°C. Susut pengeringan dinyatakan selesai

ditandai dengan adanya bunyi dari alat *moisture balance*. Hasil pada monitor kemudian dicatat (satuan %) dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk mengetahui perubahan kadar air konstan pada sampel (Depkes RI, 2008).

**6.3 Penetapan kadar air ekstrak biji kedelai.** Penetapan kadar air dilakukan menggunakan metode gravimetri. Prosedur pertama yaitu menimbang ekstrak sejumlah 10 gram sampel kedalam kurs porselin yang sudah di tara kemudian dimasukkan kedalam oven selama 5 jam pada suhu 105<sup>0</sup>C. Ulangi pengeringan dengan oven selama 1 jam hingga diperoleh bobot konstan. Pemeriksaan kadar air ekstrak biji kedelai dilakukan replikasi sebanyak 3 kali kemudian dilakukan perhitungan kadar dicatat (satuan %). Persyaratan kadar air ekstrak biji kedelai yang baik tidak melebihi dari 10% (Kemenkes RI, 2017).

**6.4 Pemeriksaan bebas etanol.** Uji bebas etanol ekstrak biji kedelai dilakukan dengan cara memasukkan sampel ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah 1 mL asam asetat (CH<sub>3</sub>COOH) dan 1 mL asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pekat kemudian dihomogenkan dan dipanaskan dengan api bunsen. Jika pada hasil uji tersebut tidak tercium bau ester, maka ekstrak positif bebas etanol (Praeparandi, 1978).

## **7. Identifikasi senyawa kimia serbuk dan ekstrak biji kedelai**

**7.1 Pembuatan larutan uji kandungan kimia.** Larutan uji dibuat dengan mendidihkan 2 g serbuk dengan aquadest ad 100 ml kemudian disaring dan melarutkan 500 mg ekstrak etanol biji kedelai menggunakan sedikit etanol 70% kemudian di tambahkan aquadest sampai 50 mL. Larutan yang sudah homogen kemudian disaring menggunakan kertas saring.

**7.2 Identifikasi flavonoid.** Larutan uji sebanyak 2 mL ditambahkan 0,1 g serbuk Mg, 1 mL HCl, dikocok dan dibiarkan memisah. Adanya senyawa flavonoid jika ada perubahan warna merah kuning pada filtrat (Handayani, 2019).

**7.3 Identifikasi alkaloid.** Larutan uji sebanyak 2 mL ditambahkan 5 mL asam klorida 2 N. Filtrat dibagi menjadi tiga kemudian dimasukkan dalam masing-masing tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan 2 tetes pereaksi *Mayer*, *Bouchardat* dan *Dragendorff*. Alkaloid positif jika terdapat endapan minimal 2 dari 3 pereaksi yang positif maka sampel dinyatakan mengandung alkaloid. Terbentuknya endapan putih atau kuning (pereaksi *Mayer*), endapan

coklat sampai hitam (pereaksi *Bouchardat*) dan endapan merah jingga (pereaksi *Dragendroff*) (Handayani, 2019).

**7.4 Identifikasi saponin.** Larutan uji sebanyak 10 mL dalam tabung reaksi dikocok selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 detik. Pembentukan busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit. Positif saponin jika dilakukan penambahan 1 tetes HCL 2N busa tidak hilang (Depkes RI, 1995).

**7.5 Identifikasi tanin dan polifenol.** Larutan uji sebanyak 2 mL ditambah 5 tetes  $\text{FeCl}_3$  lalu diamati. Positif mengandung senyawa tanin dan polifenol jika terjadi perubahan warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman. Jika ditambahkan gelatin terdapat endapan putih artinya positif tanin (Chandrashekar, 2012).

**7.6 Identifikasi steroid dan triterpenoid.** Larutan uji sebanyak 2 mL dalam cawan porselin diuapkan menggunakan WB. Residu dilarutkan menggunakan 0,5 mL kloroform lalu dipindah dalam tabung reaksi. Larutan ditambah beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchard melalui dinding tabung. Positif triterpenoid ditandai dengan adanya cincin merah sampai ungu sedangkan bila positif steroid ditandai dengan muncul cincin hijau kebiruan (Ciulei, 1984; Susanti *et al.*, 2014).

## **8. Pembuatan larutan Lancar ASI<sup>®</sup>**

Obat Lancar ASI<sup>®</sup> sebanyak 1 tablet berisi zat aktif 200 mg digerus menggunakan mortir dan stamper kemudian disuspensikan sampai 100 mL menggunakan CMC Na 0,5%.

## **9. Pembuatan larutan uji CMC Na 0,5%**

Kontrol negatif yang digunakan adalah CMC Na 0,5% yang dibuat sediaan suspensi, dengan cara menaburkan 0,5 gram CMC Na dalam aquadest hangat sedikit demi sedikit di dalam mortir dan ditunggu hingga mengembang. Larutan CMC Na apabila sudah mengembang kemudian digerus sampai homogen kemudian tambahkan 100 mL aquadest aduk sampai homogen.

## **10. Penentuan dosis**

**10.1 Penentuan dosis Lancar ASI<sup>®</sup>.** Dosis Lancar ASI<sup>®</sup> bagi manusia yang mempunyai berat badan 70 kg untuk sekali minum yaitu 200 mg. Faktor konversi dari manusia berat 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018 sehingga dosis Lancar ASI<sup>®</sup> untuk tikus adalah  $200 \text{ mg} \times 0,018 = 3,6 \text{ mg}/200 \text{ gram}$  berat badan tikus (18 mg / Kg BB tikus).

**10.2 Penentuan dosis biji kedelai.** Dosis empiris biji kedelai untuk manusia yang mempunyai berat badan 70 kg yaitu 250 gram (Fitria *et al.*, 2022). Konsentrasi dosis ekstrak etanol biji kedelai yang setara dengan biji kedelai dibuat variasi konsentrasi, yaitu  $\frac{1}{2}$  DE 325 mg/kg BB, 1DE 650 mg/kg BB, dan 2DE 650 mg/kg BB tikus.

### **11. Penyiapan hewan uji**

Hewan uji yang dipakai dalam riset ini sebanyak 30 ekor tikus putih betina galur Wistar berusia 2-3 bulan yang siap bereproduksi, dipelihara dalam kandang serta diberi minum dan makan 3x sehari (saran: perlu dilakukan orientasi pemberian pakan, penimbangan pemberian pakan dan sisa pakan). Hewan uji diaklimatisasi sebelum diberi perlakuan dengan membiasakan dalam kondisi percobaan dan kesehatannya dikontrol selama 7 hari. Tikus dikelompokkan secara acak dimana tiap kelompok berisi 5 ekor tikus yang akan mendapat perlakuan berbeda tiap kelompok, yaitu:

K1 : kontrol normal (tanpa perlakuan), hanya minum dan makan.

K2 : kontrol negatif (suspensi CMC Na 0,5%).

K3 : kontrol positif (Lancar ASI<sup>®</sup>) 18 mg/kg BB tikus.

K4 : perlakuan 1 diberi ekstrak etanol biji kedelai dosis 325 mg/kg BB tikus.

K5 : perlakuan 2 diberi ekstrak etanol biji kedelai dosis 650 mg/kg BB tikus.

K6 : perlakuan 3 diberi ekstrak etanol biji kedelai dosis 1300 mg/kg BB tikus.

### **12. Penimbangan berat badan induk tikus**

Berat badan induk tikus diukur selama pemberian sediaan uji dalam waktu 13 hari dengan selang waktu 2 hari dimulai dari hari pertama melahirkan. Penimbangan berat badan induk tikus dilakukan secara rutin sebelum dan sesudah pemberian sediaan uji. Penimbangan awal sebelum diberi sediaan uji dan setelah 6 jam diberi sediaan uji. Perhitungan selisih berat badan induk tikus dengan menghitung sebelum dan setelah menyusui.

### **13. Penimbangan berat badan anakan tikus**

Sediaan diberikan secara oral kepada masing-masing induk tikus yang melahirkan hingga masa laktasi pada pagi hari selama 14 hari. Berat badan anak tikus ditimbang secara rutin sebelum dan setelah anak menyusui dari hari ke 1 sampai hari ke 14.

#### 14. Penyiapan preparat histologi

Pertama, hewan uji dikorbankan pada hari ke-15 dengan cara merusak otak lewat leher lalu dibedah kemudian kelenjar *mammae* diambil. Jaringan difiksasi agar jaringan tidak cepat rusak dan tetap normal menggunakan formalin 10%.

Kedua, dehidrasi dilakukan selama 1,5 jam untuk tiap etanol, yaitu etanol 70%, 80%, dan 90% untuk mengeluarkan air yang terdapat dalam jaringan.

Ketiga, penjernihan (*clearing*) bertujuan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan. Alkohol dapat dihilangkan menggunakan larutan *xylene* dengan cara jaringan dimasukkan ke larutan *xylene* I selama 30 menit, *xylene* II selama 1,5 jam, dan *xylene* III selama 1,5 jam.

Keempat, pembuatan blok preparat (*blocking*) tujuannya agar organ dapat dipotong dengan mikrotom.

Kelima, jaringan ditanam dalam blok parafin (*embedding*). Jaringan dipotong memakai mikrotom sehingga ketebalan lapisan jaringan 3-4 mikrometer kemudian diletakkan di atas kaca objek diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit.

Keenam, *deparafinisasi* untuk menghilangkan kandungan parafin yang ada dalam jaringan menggunakan xylol. Jaringan dimasukkan ke xylol I, II, III, dan IV masing-masing selama 5 menit.

Ketujuh, rehidrasi dilakukan menggunakan larutan etanol untuk mengembalikan cairan ke dalam jaringan. Jaringan dimasukkan ke dalam larutan alkohol masing-masing selama 5 menit, yaitu alkohol absolut, alkohol 95%, dan 70% secara bergantian.

Kedelapan, *staining* yaitu memasukkan jaringan ke dalam larutan pewarna. Pertama memasukkan jaringan selama 5-10 menit dalam pewarna *hematoxylin*, jika jaringan sudah berwarna ungu lalu dicuci menggunakan air mengalir. Kedua memasukkan jaringan selama 1-2 menit menggunakan pewarna *eosin* lalu dicuci menggunakan air mengalir.

Kesembilan, rehidrasi bertujuan untuk mengawetkan jaringan dengan cara menarik air dari dalam jaringan. Jaringan dicelupkan 4 kali masing-masing selama 30 detik secara berurutan dalam larutan etanol 70%, 80%, dan 90%. Jaringan kemudian direndam menggunakan etanol absolut selama 1 menit sebanyak 4 kali.

Kesepuluh, penjernihan (*clearing*) dikerjakan dengan cara jaringan dimasukkan ke dalam larutan xylen I kemudian di *mounting*.

*Mounting* adalah petutupan sediaan memakai perekat berupa gelatin kemudian ditutup menggunakan *deck glass*.

### **15. Pemeriksaan histologi kelenjar *mammae***

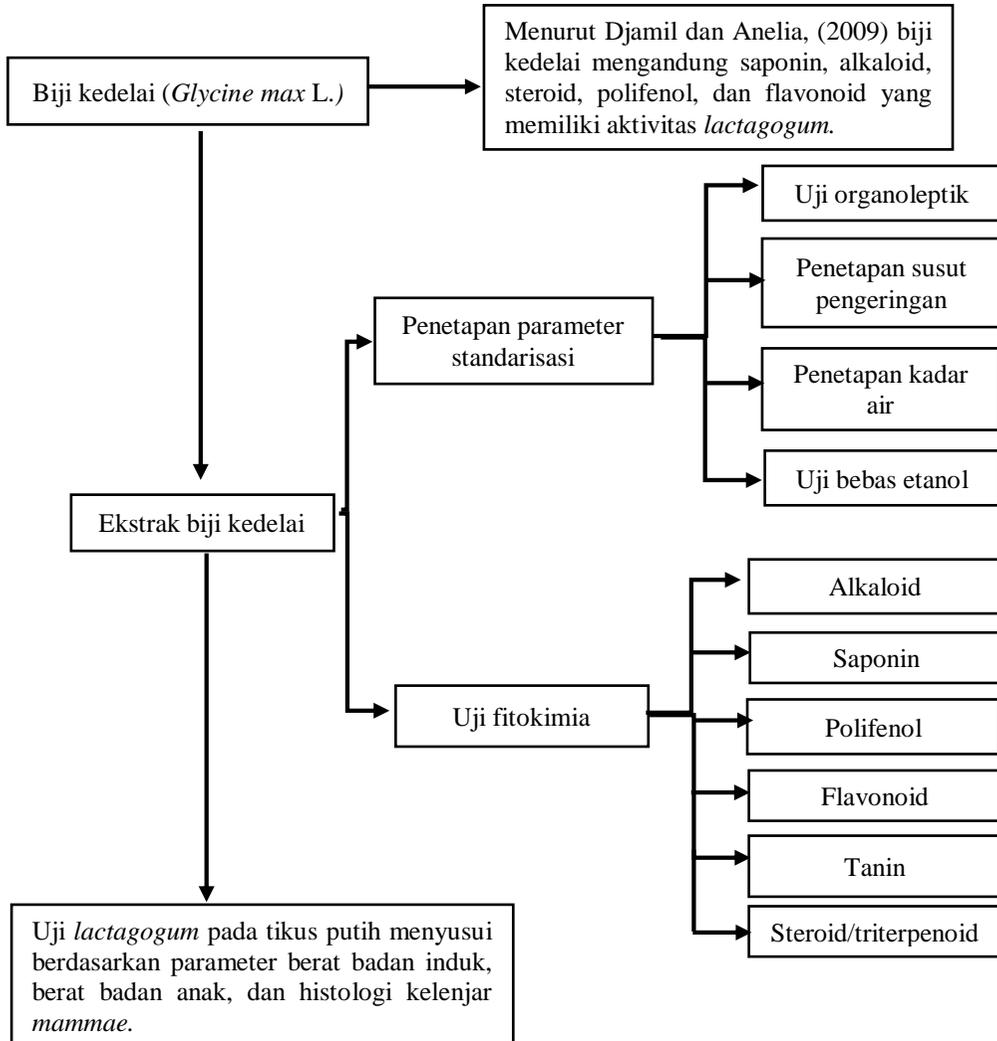
Sampel dihitung jumlah dan diukur diameter alveoli memakai mikroskop trinokuler perbesaran 400x. Jumlah alveoli diletakkan di atas preparat kemudian diamati 3 lapang pandang mikroskop. Diameter alveoli diamati 3 buah alveoli dengan bantuan mikroruler (Kharisma *et al.*, 2011).

### **E. Analisis Hasil**

Data yang didapat saat penelitian berupa data selisih berat badan induk, berat badan anak tikus, dan gambaran histologi kelenjar *mammae* induk tikus dianalisis untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan menggunakan *software SPSS for Windows Release 21.0*.

Data diolah menggunakan *Shapiro-Wilk*, apabila data terdistribusi normal dilanjutkan uji *One-Way Analysis of Variance*, apabila ada perbedaan dilanjutkan uji *Tukey*. Uji *Tukey* dilakukan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda. Data yang tidak terdistribusi normal dilanjutkan uji *Kruskall-Wallis*, jika ada perbedaan dilanjutkan uji *Mann-Whitney*.

## F. Kerangka Pikir Penelitian



Gambar 2. Skema kerangka pikir penelitian.