

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun pare (*Momordica charantia* L.) segar yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun pare yang masih segar, berwarna hijau, bebas jamur dan tidak rusak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian ini pertama yaitu ekstrak dari daun pare yang diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Variabel kedua yaitu efek antihiperglikemik pada mencit yang diinduksi STZ-NA. Variabel ketiga perbaikan histopatologi sel β pankreas mencit yang diinduksi induksi STZ-NA.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama adalah identifikasi dari seluruh sampel. Variabel utama diklasifikasikan ke macam-macam variabel yaitu:

2.1. Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang diubah-ubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% daun pare pada mencit dengan berbagai dosis.

2.2. Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah variabel yang menjadi fokus penelitian yang diukur untuk mengetahui besarnya efek atau pengaruh variabel bebas. Variabel tergantung penelitian ini adalah penurunan kadar glukosa darah dan perbaikan profil histopatologi sel β pankreas mencit yang diinduksi STZ-NA

2.3. Variabel terkontrol. Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan batasan-batasan kualifikasinya dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah umur mencit, jenis kelamin mencit, berat badan mencit, galur hewan uji, pakan yang diberikan, kondisi fisik, kondisi lingkungan dan kondisi laboratorium serta kondisi peneliti.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun pare adalah daun pare yang diambil masih dalam keadaan segar, berwarna hijau, bebas jamur dan tidak rusak yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun pare adalah serbuk yang berasal dari daun pare setelah melalui proses pengeringan dengan diangin-anginkan kemudian diblender menjadi serbuk halus yang dapat melalui ayakan mesh no. 40.

Ketiga, ekstrak daun pare adalah hasil dari ekstraksi daun pare menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga didapat ekstrak kental daun pare.

Keempat, dosis ekstrak etanol daun pare adalah dosis ekstrak yang dibuat dari daun pare dengan 3 dosis yang berbeda yang diberikan pada mencit secara oral.

Kelima, mencit adalah hewan uji yang digunakan dengan nama latin *Mus musculus* galur BALB-C berjenis kelamin jantan dan berusia 12-14 minggu dengan bobot badan lebih dari 20 g.

Keenam, glibenklamid adalah obat yang digunakan untuk menurunkan hiperglikemik dan juga digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian.

Ketujuh, metode uji induksi STZ-NA adalah metode uji dengan cara diawali dengan injeksi NA 120 mg/kgBB mencit dan 15 menit setelahnya dilanjutkan dengan injeksi STZ dengan dosis 50 mg/kgBB secara intraperitoneal.

Kedelapan, efek antihiperglikemik adalah efek kemampuan ekstrak etanol daun pare dalam memberikan aktivitas penurunan glukosa darah dari hewan uji sebelum dan sesudah diberikan perlakuan.

Kesembilan, dosis efektif adalah dosis terkecil yang memberikan efek penurunan kadar glukosa darah pada mencit yang sebanding dengan kontrol positif

Kesepuluh, histopatologi pankreas adalah perubahan perbaikan yang terjadi pada pankreas mencit yang mengalami nekrosis seperti piknosis (pengecilan dan mengkerut), karioreksis (pecahnya inti sel), dan kariolisis (lisis atau hilang) akibat induksi STZ-Na.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah timbangan digital, nampan, ember, pisau, blender, ayakan *mesh* no.40, oven, bejana maserasi, corong, kertas saring, kain *flannel*, *rotary evaporator*, *water bath*, *beaker glass*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, pipet tetes, batang pengaduk, cawan petri, mortir, stamper, *aluminium foil*, *sterling-bidwell*, sonde oral, kandang mencit, tempat pakan dan minum mencit, *glucometer easy touch* dan tes strip, alat bedah (pinset, *scalpel*, meja, pisau/gunting) object glass, deg glass, pot salep, mikrotom putar (*rotary microtome*), counter dan mikroskop cahaya.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun pare, etanol 96%, toluena jenuh air, aquadest, H₂SO₄ pekat, serbuk Mg, HCl 2N, amil alkohol, amoniak, STZ-NA, kloroform, pereaksi *Mayer*, pereaksi *Dragendorff*, pereaksi *Bouchardat*, Na. CMC 0,5%, FeCl 1 %, larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%), STZ-NA, glibenklamid, mencit putih jantan, formalin 10%.

D. Jalannya Penelitian

1. *Ethical clearance*

Pada penelitian ini hewan uji yang digunakan yaitu mencit *Mus musculus* galur BALB-C berjenis kelamin jantan. Sebelum dilakukan penelitian hewan uji harus mendapatkan persetujuan izin etis dengan melakukan *ethical clearance*. *Ethical clearance* adalah surat keterangan tertulis yang berisi tentang pernyataan bahwa penelitian yang dirancang layak untuk dilakukan pada makhluk hidup (hewan, manusia, tumbuhan). *Ethical clearance* hewan uji pada penelitian ini dilakukan di Komite Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi.

2. Determinasi tanaman pare

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah tanaman pare. Selanjutnya tanaman tersebut dilakukan determinasi tanaman. Tujuan dilakukan determinasi untuk mengetahui kebenaran dan keaslian tanaman pare yang akan digunakan sebagai sampel dalam penelitian. Selain itu determinasi tanaman dilakukan untuk mencocokkan ciri-ciri yang terdapat pada tanaman sesuai dengan determinasi yang terdapat pada jurnal acuan. Determinasi tanaman pare dilakukan di Laboratorium Program Studi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

3. Pembuatan simplisia

Pembuatan simplisia daun pare dilakukan dengan cara pengumpulan bahan pilih daun pare dengan kriteria daun yang digunakan yaitu daun yang berwarna hijau, masih utuh dan bebas dari jamur. Setelah itu daun disortasi basah terlebih dahulu untuk memisahkan kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari tumbuhan dengan cara membuang bagian dari tumbuhan yang tidak diperlukan. Selanjutnya daun dicuci bersih dengan air mengalir. Daun yang sudah bersih kemudian diangin-anginkan. Metode pengeringan dilakukan dengan cara dioven pada suhu 40°C. Langkah selanjutnya sortasi kering dengan cara sampel yang sudah kering di hilangkan batang daunnya dan hanya menggunakan bagian daunnya saja, kemudian simplisia dihaluskan menggunakan blender. Serbuk diayak dengan ayakan *mesh* ukuran 40 kemudian timbang serbuk simplisia kering.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun pare

Uji susut pengeringan serbuk daun pare menggunakan *moisture balance*. Langkah yang dilakukan pada tahap ini yaitu memasukan serbuk daun pare sebanyak 2 g, dimasukkan dalam cakram yang telah ditara dan ditimbang. Cakram yang berisi serbuk daun pare kemudian dipanaskan pada suhu 105° C, pengukuran akan berhenti dengan ditandai adanya bunyi alarm dan tekan % untuk mengetahui persentase kadar air yang terukur. Susut pengeringan daun pare bertujuan untuk mengetahui pengurangan berat bahan setelah dikeringkan. Susut pengeringan yang baik pada serbuk simplisia daun pare apabila telah sesuai dengan standar yaitu kurang dari 10% (Depkes RI, 2017).

5. Penetapan kadar air serbuk daun pare

Uji penetapan kadar air menggunakan metode azeotropi (destilasi toluen). Prosedurnya dengan penambahan 20g bubuk simplisia ke dalam labu yang menampung sekitar 200 ml toluen jenuh air dan memanaskan labu secara perlahan selama 15 menit. Kecepatan penyulingan tetesan setelah toluena mendidih diatur pada dua tetes per detik, dan meningkat menjadi empat tetes per detik setelah sebagian air telah disuling, lanjutkan destilasi sampai semua air menguap dan air dalam penampung tidak bertambah lagi. Kurang lebih 15 menit destilasi, tabung penerima dibiarkan dingin hingga mencapai suhu kamar. Volume air diukur setelah toluena dan air telah terpisah sepenuhnya. Hitung % kadar air dari berat awal sampel. Apabila kadar air pada bubuk simplisia daun pare kurang dari 9,2% maka telah sesuai dengan standar (Depkes RI, 2017).

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{Volume yang terbaca}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

6. Pembuatan ekstrak daun pare

Pembuatan ekstrak daun pare berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia (2017). Sebanyak 300g serbuk kering simplisia daun pare dimasukan kedalam maserator, lalu ditambahkan pelarut etanol 96%. Pembuatan ekstrak etanol daun pare dilakukan dengan metode maserasi yaitu dengan perbandingan simplisia:etanol (1:10) dan ditutup rapat menggunakan aluminium foil dan jauhkan dari sinar matahari langsung. Proses perendaman dilakukan selama 3 x 24 jam dengan 6 jam pertama sesekali dilakukan pengadukan, kemudian diamkan selama 18 jam. Ekstrak disaring menggunakan corong *buchner*. Larutan yang didapatkan ditampung pada erlenmeyer. Gunakan setengah jumlah pelarut dari penyarian awal dan jenis pelarut yang sama untuk mengulangi proses penyarian setidaknya sekali atau dilakukan remaserasi. Mendapatkan ekstrak pekat dengan konsentrasi lebih besar dengan mengumpulkan seluruh maserat dan gunakan *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut pada suhu 40°C. Tentukan rendemen yang diperoleh dengan menimbang serbuk simplisia dan menghitung persentase berat (b/b) antara ekstrak dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan. Alur cara pembuatan ekstrak etanol daun pare dapat dilihat pada gambar 4.

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental}}{\text{Bobot serbuk}} \times 100\%$$

7. Penetapan kadar air ekstrak

Ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 1-2 g dan dimasukan ke dalam krus porselen yang telah ditara dan yang telah dikeringkan pada suhu 105°C selama 30 menit dinginkan lalu timbang. Ekstrak dimasukan ke dalam krus yang telah ditara. Keringkan pada suhu 105 selama 5 jam pertama, keluarkan lalu masukan dalam esikator hingga dingin kemudian timbang. Lakukan pengeringan dan timbang pada selang waktu 1 jam hingga bobot tetap. Kadar air yang baik pada ekstrak daun pare apabila telah sesuai dengan standar yaitu kurang dari 9,2% (Depkes RI, 2017).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Bobot sebelum dikeringkan (g)} - \text{Bobot sesudah dikeringkan (g)}}{\text{Bobot sebelum dikeringkan (g)}} \times 100\%$$

8. Uji bebas etanol ekstrak daun pare

Melakukan uji ekstrak daun pare bebas etanol dengan cara masukkan 1 ml asam sulfat pekat dan 1 ml asam asetat ditambahkan ke

larutan ekstrak etanol daun pare dalam tabung reaksi kocok hingga homogen. Setelah homogenisasi, campuran dipanaskan di atas api bunsen dan kapas digunakan untuk menutup tabung. Ekstrak dinyatakan positif bebas etanol jika hasil pengujian tidak menunjukkan bau ester (Fatmawati *et al.*, 2021).

9. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun pare

Ekstrak etanol daun pare dilakukan identifikasi kandungan kimianya untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat di dalamnya. Ekstrak etanol daun pare kandungan metabolit sekunder yang diidentifikasi yaitu senyawa flavonoid, saponin, alkaloid, dan tanin. Percobaan ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi Surakarta.

9.1. Identifikasi flavonoid. Timbang 1 g ekstrak etanol daun pare larutkan dengan 1 ml air. Tambahkan 0,1 g serbuk Mg dan HCl Pekat sebanyak 10 ml kemudian gojog. Positif (+) adanya flavonoid jika pada tabung berubah warna menjadi merah jingga sampai merah ungu, atau berwarna kuning jingga (Materia Medika Indonesia Jilid V, 1989).

9.2. Identifikasi alkaloid. Ekstrak daun pare sebanyak 0,5 g ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskan selama 2 menit, dinginkan lalu kemudian disaring. Filtrat dipakai untuk uji alkaloid. Diambil 3 tabung reaksi dimasukkan 2 ml filtrat setiap tabungnya. Tabung pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi *Mayer*, tabung kedua diteteskan 2 tetes pereaksi *Dragendorff* dan tabung ketiga diteteskan 2 tetes *Bouchardat*. Positif senyawa alkaloid apabila pada uji pelarut *Mayer* membentuk endapan putih hingga kekuningan. Pelarut *Dragendorff* menghasilkan endapan berwarna merah bata, sedangkan pelarut *Bouchardat* menghasilkan endapan coklat. Hasil positif mengandung senyawa alkaloid jika terjadi perubahan warna atau paling sedikit dua dari tiga percobaan diatas (Materia Medika Indonesia Jilid V, 1989).

9.3. Identifikasi tanin. Timbang ekstrak sebanyak 0,5 g, tambahkan dengan 10 ml air suling kemudian panaskan selama 30 menit sambil diaduk hingga mendidih. Dinginkan kemudian larutan tersebut disaring menggunakan kertas saring. Setelah itu, 5 ml filtrat yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditetesi 2 tetes reagen FeCl_3 . Jika terjadi perubahan warna menjadi warna hitam hingga kebiruan maka positif adanya tanin (Materia Medika Indonesia Jilid V, 1989).

9.4. Identifikasi saponin. Siapkan tabung reaksi, kemudian tambahkan 1 gram ekstrak etanol daun pare ke dalamnya. Tambahkan sebanyak 10 ml air suling kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik hingga terbentuk busa. Apabila positif mengandung saponin maka akan menghasilkan busa dengan tinggi kurang dari 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit dan pada penambahan 1 tetes HCl 1% bila busa stabil atau tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Materia Medika Indonesia Jilid V, 1989).

10. Penentuan dosis

10.1. Dosis glibenklamid. Dosis lazim glibenklamid untuk manusia dewasa sebesar 5 mg (sekali sehari). Perhitungan dosis dari manusia (70 kg) ke mencit (20 g) adalah sebesar 0,013 mg/20g BB mencit. Perhitungan dosis glibenklamid dapat dilihat pada lampiran 15.

10.2. Dosis STZ-NA. Dosis yang digunakan untuk membuat mencit hiperglikemik adalah dosis STZ 50 mg/kgBB mencit, dan NA dengan dosis 120 mg/kgBB mencit secara intraperitoneal. Perhitungan dosis STZ-NA dapat dilihat pada lampiran 15.

10.3. Perhitungan dosis ekstrak. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa dosis efektif ekstrak metanol daun pare pada penelitian Mahmud (2019) adalah 280 mg/ kgBB mencit, sehingga dosis yang digunakan pada penelitian ini menggunakan variasi dosis lebih kecil dari dosis efektif yaitu 70 mg/ kgBB mencit, 140 mg/ kgBB mencit, 280 mg/ kgBB mencit. Perhitungan dosis ekstrak dapat dilihat pada lampiran 15.

11. Pembuatan larutan uji

11.1. Pembuatan larutan Na CMC 0,5%. Larutan Na. CMC dengan konsentrasi 0,5% dibuat dengan masukan sebanyak 0,5g Na. CMC dalam mortar panas kemudian masukan sedikit demi sedikit aquadest hangat lalu diaduk hingga 100 ml aquadest. Larutan Na. CMC digunakan untuk pengentalan atau pengikat emulsi. Pemilihan larutan Na. CMC dikarenakan larutan emulsi tidak mempengaruhi penurunan kadar glukosa darah.

11.2. Pembuatan larutan STZ-NA. STZ dosis 50 mg/kgBB dilarutkan dengan 10 ml larutan buffer sitrat pH 4,5. NA dosis 120 mg/kgBB dilarutkan dengan 10 ml larutan salin 0,9%.

11.3. Larutan suspensi glibenklamid 0,005%. Gerus 1 tablet glibenklamid yang mengandung 5 mg bahan aktif dan dimasukkan ke

dalam mortir hangat kemudian ditambahkan 100 ml suspensi Na. CMC 0,5% hangat sedikit demi sedikit hingga homogen.

11.4. Larutan suspensi ekstrak etanol daun pare 2%. Ekstrak etanol daun pare ditimbang 2 g dan Na. CMC 0,5 g. Na.CMC ditaburkan diatas air panas pada mortir tunggu hingga Na.CMC mengembang lalu aduk hingga homogen. Masukkan ekstrak ke dalam mortir aduk hingga homogen, kemudian ditambahkan sisa air hingga volume 100 ml.

12. Penginduksian hiperglikemik

Proses induksi diawali dengan injeksi NA 120 mg/kgBB mencit dengan rute pemberian secara intraperitoneal dan 15 menit setelahnya dilanjutkan dengan injeksi STZ secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg/kgBB mencit. Menyebabkan kondisi hiperglikemia dalam waktu 3 hari (Birgani *et al.*, 2018).

13. Pengelompokan dan perlakuan pada hewan uji

Hewan uji pada penelitian ini yaitu mencit *Mus musculus* galur BALB-C berjenis kelamin jantan dan berusia 7-8 minggu dengan bobot badan lebih dari 20g, dengan keadaan sehat. Hewan uji diaklimatisasi terlebih dahulu kurang lebih 7 hari dengan pemberian perlakuan yang sama yakni dengan memberikan makanan dan minuman dalam jumlah yang sama. Hewan uji kemudian dikelompokkan menjadi 6 kelompok. Sebanyak 24 mencit jantan dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, dimana setiap kelompok terdiri dari 4 ekor mencit dan akan mendapatkan perlakuan yang beda.

Kelompok I : kontrol negatif (mencit diberikan CMC 0,5%)

Kelompok II : kontrol positif (diberikan glibenklamid 0,013 mg/20gBB mencit) selama 14 hari.

Kelompok III : kontrol normal (tanpa perlakuan)

Kelompok IV : mencit diberikan ekstrak etanol daun pare dengan dosis 70 mg/kgBB mencit selama 14 hari.

Kelompok V : mencit diberikan ekstrak etanol pare dengan dosis 140 mg/kgBB mencit, selama 14 hari.

Kelompok VI : mencit diberikan ekstrak etanol daun pare dengan dosis 280 mg/kgBB mencit selama 14 hari.

14. Prosedur pengujian

Mencit diberi tanda, mencit yang digunakan sebanyak 24 ekor mencit putih jantan. Hewan uji yang digunakan adalah mencit *Mus musculus* galur BALB-C berjenis kelamin jantan dan berusia 7-8 minggu dengan bobot badan lebih dari 20 g. Hewan uji dalam penelitian ini akan

dibagi dalam 6 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor mencit. Sebelumnya mencit dipuasakan terlebih dahulu selama 16 jam. Pada hari pertama dilakukan pengukuran kadar glukosa awal (T_0). STZ diinjeksi secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg/kgBB, dan terlebih dahulu diinjeksikan NA 15 menit sebelumnya dengan dosis 120 mg/kgBB secara intraperitoneal. Tiga hari setelah induksi kadar glukosa darah mencit kembali diukur (T_1), untuk memastikan sudah terjadi peningkatan kadar glukosa pada mencit yang diinduksi STZ-NA. Parameter mencit dikatakan hiperglikemik apabila terjadinya perbedaan atau selisih antara kadar glukosa darah pada (T_0) dengan (T_1). Masing-masing kelompok diberi CMC 0,5% (kelompok kontrol negatif), serbuk glibenklamid (kelompok kontrol positif), tanpa perlakuan kontrol normal), ekstrak daun pare dosis 70 mg/kgBB mencit, dosis 140 mg/kgBB mencit, dosis 280 mg/kgBB mencit secara oral setiap hari. Pada hari ke 7 (T_2), dan 14 (T_3) setelah perlakuan dilakukan pengukuran kadar glukosa, setelah pemberian sediaan uji. Kadar glukosa darah ditetapkan dan dibaca dengan alat glukometer. Pada hari ke 15 semua mencit dikorbankan dengan cara dianestesi, organ pankreas mencit diambil, kemudian dijadikan preparat untuk diamati keadaan histopatologinya. Skema prosedur pengujian dapat dilihat pada gambar 5.

15. Uji histopatologi pankreas

Hewan coba di anestesi dengan kloroform lalu dikorbankan, kemudian mencit dibedah bagian pankreas diambil. Organ pankreas kemudian diawetkan dengan buffer neutral formalin (BNF) 10% dan sebelumnya dicuci terlebih dahulu dengan NaCl fisiologis 0,9% untuk dilanjutkan dengan pembuatan preparat histopatologi melalui beberapa tahap sebagai berikut:

Pertama, organ pankreas yang didekapitasi diambil dan dimasukkan ke dalam pot plastik. Organ-organ ditandai dengan memberi label kode kelompok mencit sesuai kelompok perlakuan pada pot plastik. Organ langsung difiksasi dengan merendamnya dalam formalin buffer fosfat 10% selama satu hari penuh untuk mencegah kerusakan preparat. Organ pankreas yang telah difiksasi, dilakukan pemotongan dan dimasukkan ke dalam *tissue cassette*, dan dibersihkan dengan air mengalir selama setengah jam.

Kedua, tahap dehidrasi, dimana cairan jaringan dikeluarkan. Jaringan pankreas setelah dimasukkan dalam kaset jaringan, jaringan

pankreas direndam dalam etanol selama satu jam dengan tahapan sebagai berikut: etanol 70%, 80%, dan 90%, setelah itu dilakukan perendaman selama satu jam dalam etanol absolut I, etanol absolut II, dan etanol absolut III.

Ketiga, dilakukan proses penjernihan (clearing) alkohol dibersihkan melalui proses (dealkoholisasi), yang dilakukan dengan menggunakan larutan xilena. Jaringan pankreas pertama-tama harus ditempatkan dalam xylene I selama 20 menit, diikuti oleh xylene II dan xylene III masing-masing selama 20 menit.

Keempat, melakukan proses infiltrasi paraffin. Organ dicelupkan ke dalam parafin panas untuk membuat jaringan lebih keras dan mudah dipotong menggunakan mikrotom. Awalnya, jaringan direndam dalam parafin I, parafin II, dan parafin III pada suhu 60°C selama satu jam.

Kelima, langkah selanjutnya yang disebut tahap embedding atau penanaman jaringan ke dalam blok paraffin. Pemotongan dengan mikrotom menghasilkan lapisan setebal 5 mikrometer, lapisan jaringan diletakkan pada kaca objek diwarnai.

Keenam, tahap pewarnaan hematoksilin dan eosin. Digunakan untuk menghilangkan parafin dari jaringan, tahap ini diawali dengan deparafinisasi menggunakan xylem. Langkah awal, jaringan direndam dalam xilena I selama tiga menit, dilanjutkan dengan xylem selama tiga menit.

Ketujuh, Rehidrasi jaringan dengan larutan etanol bertujuan untuk mengisi kembali jaringan dengan cairan. Jaringan direndam selama tiga menit dalam masing-masing larutan berikut: etanol absolut I, etanol absolut II, dan terakhir direndam dalam etanol 80% dan 70% secara bergantian selama tiga menit.

Kedelapan, dilakukan tahap staining jaringan yaitu jaringan dimasukkan ke dalam larutan pewarna. Jaringan dimasukan ke dalam pewarna hematoksilin dan didiamkan selama 10 hingga 20 menit. Jaringan yang sudah berwarna kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Kemudian direndam kembali selama 10 menit untuk menyelesaikan proses pewarnaan.

Kesembilan, dilakukan rehidrasi jaringan dengan tujuan menghilangkan air jaringan agar awet dan mencegahnya kerusakan yang terlalu cepat. Jaringan direndam selama 30 detik masing-masing dalam larutan etanol 70%, 80%, dan 90%, setelah itu direndam dalam etanol absolut sebanyak empat kali dengan durasi masing-masing satu menit.

Kesepuluh, jaringan dilakukan proses penjernihan atau clearing dengan cara dimasukkan ke dalam larutan xilem I dan dilakukan mounting, yang meliputi penutupan sediaan dengan gelatin sebagai perekat dan ditutup dengan desk glass.

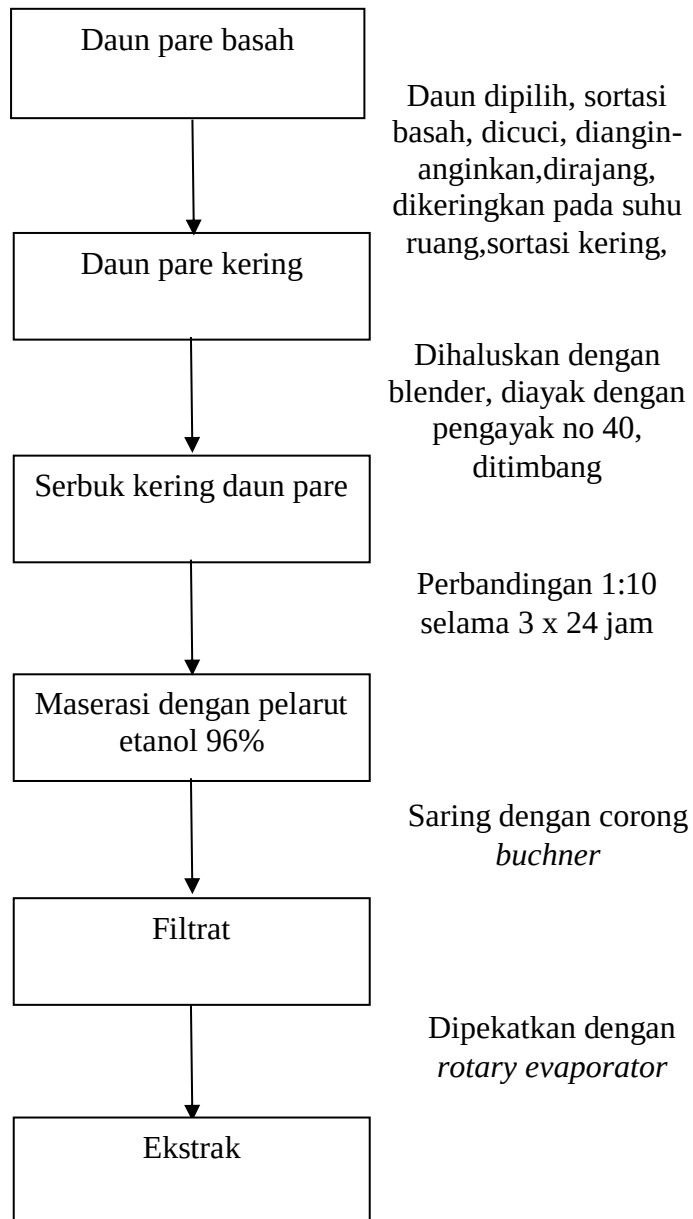
Kesebelas, preparat histopatologi dilakukan dibawah mikroskop. Pemeriksaan dengan mikroskop dilakukan pada perbesaran 1000x. Histopatologi pankreas yang diamati meliputi adanya nekrosis. Alur uji histopatologi dapat dilihat pada gambar 6.

E. Analisis Data

Pertama, dilakukan analisis statistik untuk melihat distribusi serta homogenitas data kadar glukosa darah. Pertama sebelum melakukan uji statistik terlebih dahulu dilakukan uji normalitas data dan uji homogenitas data. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui distribusi data normal atau tidak. Apabila data terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji homogenitas. Apabila data terdistribusi tidak normal maka uji statistik yang dilakukan adalah uji non parametrik. Data yang terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji homogenitas untuk mengetahui apakah data kadar glukosa darah dalam penelitian homogen atau tidak homogen. Jika data yang dinyatakan terdistribusi normal dan homogen, maka uji dilanjutkan dengan uji parametrik. Apabila data dinyatakan tidak terdistribusi normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji non parametrik.

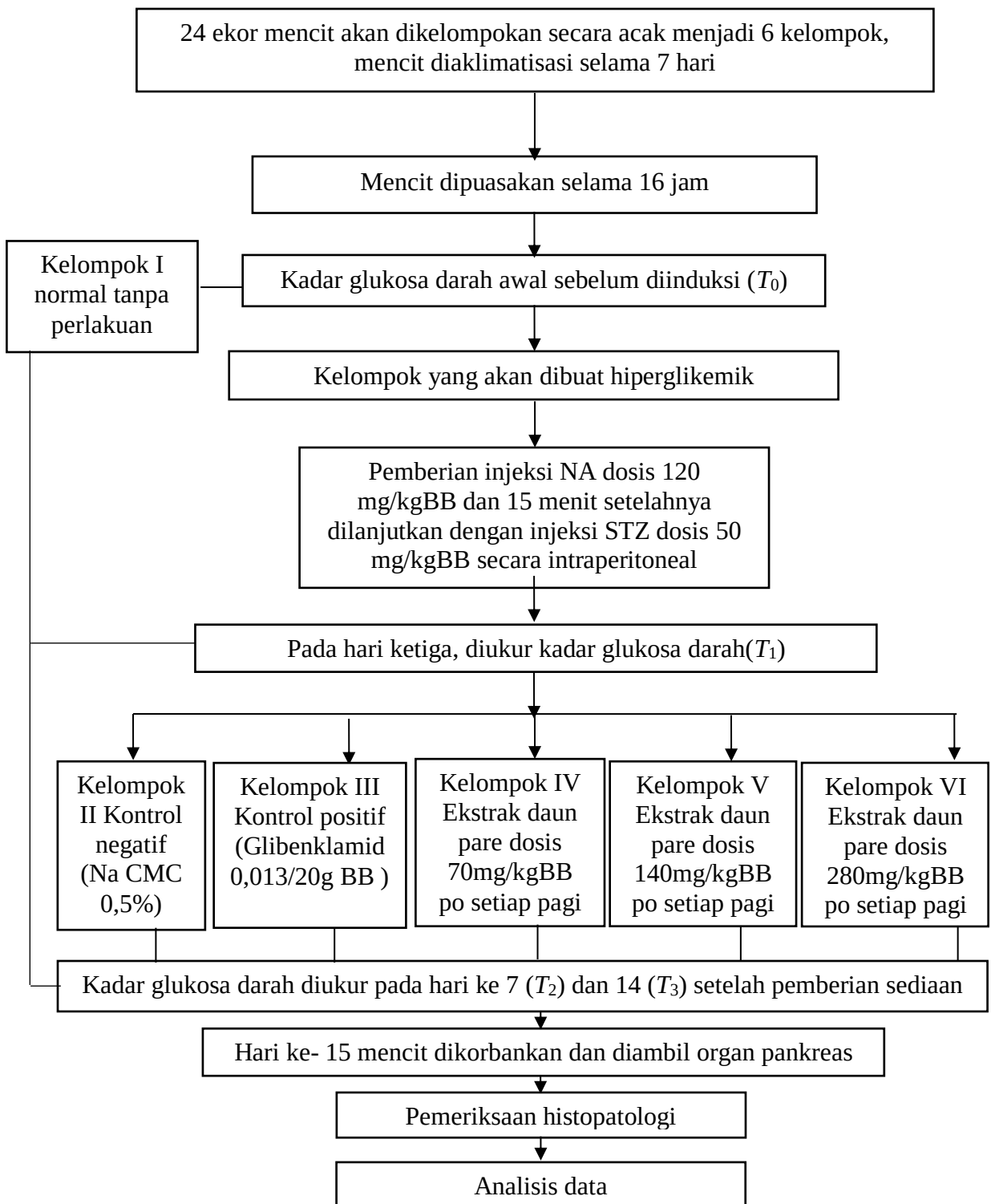
F. Alur penelitian

1. Alur cara pembuatan ekstrak daun pare.



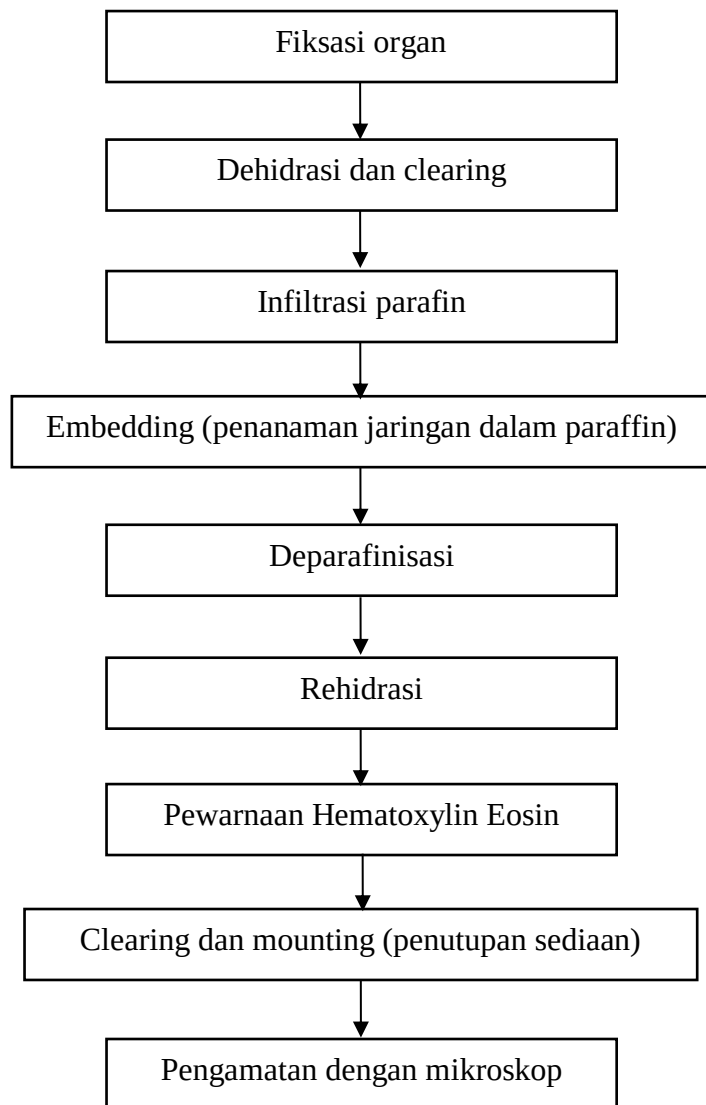
Gambar 4. Alur cara pembuatan ekstrak daun pare.

2. Skema prosedur pengujian.



Gambar 5. Skema prosedur pengujian

3. Alur uji histopatologi



Gambar 6. Alur uji histopatologi.