

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah Tanaman mangga arumanis (*Mangifera indica* L. Var. Arum manis) yang diperoleh dari Sukoharjo, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah pucuk daun mangga arum manis (*Mangifera indica* L. Var. Arum manis) diambil secara acak berwarna hijau, daun muda yang berada di ujung tangkai daun dan tidak rusak yang diperoleh di Sukoharjo, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Penelitian ini fokus pada pengaruh ekstrak daun pucuk mangga arum manis yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% terhadap kadar glukosa dalam darah mencit putih jantan yang telah diinduksi aloksan. Penelitian ini juga mengevaluasi dampaknya terhadap jumlah pulau *Langerhans* serta perbaikan profil histopatologi pankreas mencit yang terpapar aloksan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama mencakup semua variabel yang menjadi fokus penelitian, setelah variabel utama diidentifikasi langkah selanjutnya adalah mengelompokkan variabel-variabel tersebut ke dalam kategori-kategori yang berbeda, seperti variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas merujuk pada faktor yang sengaja dimanipulasi untuk menilai dampaknya terhadap variabel yang dipengaruhi. Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol 70% dengan berbagai dosis berfungsi sebagai variabel bebas. Variabel tergantung yang diamati adalah perubahan kadar gula darah pada mencit yang diberi perlakuan ekstrak etanol 70% dalam dosis yang berbeda-beda. Variabel tergantung ini menggambarkan hasil dari perlakuan utama, yakni dampak aktivitas antihiperlikemia pada mencit putih jantan

yang diberi ekstrak pucuk daun mangga arum manis, serta kondisi organ pankreas menciut setelah perlakuan dengan ekstrak etanol 70% pada dosis yang bervariasi.

Variabel terkontrol merujuk pada faktor-faktor yang dapat mempengaruhi variabel dependen, yang perlu diatur atau dijaga agar tidak memengaruhi hasil penelitian, sehingga memungkinkan penelitian lain untuk memperoleh temuan yang konsisten. Penelitian ini terdapat variabel terkontrol mencakup berbagai aspek terkait hewan uji, seperti berat badan, jenis kelamin, usia, galur, kondisi laboratorium, serta keberadaan peneliti yang turut memengaruhi hasil penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, pucuk daun mangga arumanis ialah daun yang berwarna hijau, daun muda yang berada diujung tangkai yang diperoleh dari pohon mangga arum manis yang berasal dari Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk pucuk daun mangga arumanis dihasilkan melalui proses pengeringan, penggilingan, dan penyaringan pucuk daun mangga arumanis menggunakan ayakan dengan ukuran mesh 40.

Ketiga, ekstrak dari pucuk daun mangga arumanis diperoleh melalui proses penyarian dengan menggunakan metode maserasi, di mana pelarut yang dipakai adalah etanol 70%, setelah itu ekstrak yang dihasilkan diproses lebih lanjut dengan cara pemekatan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Penggunaan etanol 70% sebagai pelarut dipilih karena kemampuannya dalam menarik senyawa aktif lebih banyak dibandingkan pelarut organik lainnya. Etanol memiliki titik didih yang relatif rendah, sehingga membutuhkan energi panas yang lebih sedikit untuk proses pemekatan. Keunggulan lain dari etanol adalah sifatnya yang tidak beracun dan aman untuk konsumsi, berkat tingkat toksisitasnya yang lebih rendah jika dibandingkan dengan pelarut lain (Farida *et al.*, 2012).

Keempat, adalah kadar gula darah ialah kadar yang diukur dengan menggunakan glukometer sesudah dan sebelum diberikan perlakuan dengan menggunakan ekstrak pucuk daun mangga arum

manis sebelum dipuaskan selama 12 jam. Perbandingan kadar gula darah dijalankan sebagai analisa statistik.

Kelima, mencit putih yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 20 g yang diinduksikan dengan aloksan sehingga mengalami diabetes. Berat badan diamati sebelum dan sesudah diinduksi.

Keenam, amati perubahan yang terjadi baik penurunan atau kenaikan pada berat badan pada mencit jantan baik setelah atau sebelum pemberian kontrol dan ekstrak.

Ketujuh, efek yang diamati adalah efek dari penurunan kadar gula darah dan berat badan pada mencit jantan yang paling maksimal.

Kedelapan, gambaran histopatologi pankreas mencit jantan yaitu perbedaan pada pulau pankreas hewan uji pada mencit jantan yang sudah diinduksi aloksan dan pengamatan perubahan persentase nekrosis sel islet pulau *Langerhans* pankreas terhadap jumlah sel normal.

Kesembilan, dosis efektif merupakan dosis terkecil yang mampu menurunkan kadar gula darah, memperbaiki sel beta pankreas, dan mengurangi tingkat nekrosis sel islet pulau *Langerhans* pada histopatologi pankreas. Penelitian ini menggunakan variasi dosis efektif daun yang mencakup 52,5 mg/kg BB, 105 mg/kg BB, dan 210 mg/kg BB.

C. Alat, Bahan, dan Hewan Uji

1. Alat

Peralatan yang digunakan untuk pembuatan simplisia antara lain oven dengan suhu yang rendah dan stabil, mesin penggiling, serta ayakan dengan ukuran mesh no. 40. Proses penyarian, digunakan seperangkat alat maserasi, evaporator, bejana maserasi, kain fanel, kertas saring, neraca elektrik, pipet, tabung reaksi, dan Beaker glass. Penimbangan berat badan mencit menggunakan timbangan hewan Pengukuran kadar air, alat yang digunakan adalah *Sterling-Bidwell*. Perlakuan terhadap hewan uji, berbagai alat seperti timbangan, jarum oral, spuit injeksi insulin 1.0 ml, pipa kapiler, gelas ukur, Beaker glass, dan kandang mencit diperlukan. Pengukuran kadar glukosa darah mencit, digunakan glukometer, sedangkan untuk persiapan histopatologi, digunakan berbagai peralatan bedah (seperti

scalpel, pinset, pisau, gunting, jarum, dan meja lilin), mikrotom putar (*rotary microtome*), *object glass*, *deck glass*, serta mikroskop cahaya.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah pucuk daun mangga arum manis (*Mangifera indica L. Var. Arumanis*) yang segar, secara acak berwarna hijau, daun muda yang berada di ujung tangkai daun dan tidak rusak yang diperoleh dari Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini mencakup etanol 70% sebagai pelarut utama. Pengujian farmakologi menggunakan aloksan monohidrat, CMC-Na 0,5%, larutan NaCl 0,9%, serta aquadest. Pengukuran kadar gula darah menggunakan glukometer dan bahan yang diperlukan untuk pengamatan histopatologi meliputi formalin PA, larutan pewarna Haematoxylin Eosin, formaldehid, etanol, xylen, dan alkohol, sedangkan untuk uji identifikasi senyawa tanaman, digunakan alkohol, anhidrida asam asetat, kloroform, asam sulfat, HCl 2N, serbuk magnesium, amil alkohol, xylene, asam klorida, besi (III) klorida, dan air suling.

3. Hewan percobaan

Penelitian ini menggunakan mencit putih jantan sebagai hewan percobaan, dengan usia 2-3 bulan dan berat sekitar 20 gram, sebanyak 25 ekor. Proses pengelompokan dilakukan secara acak dengan setiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Semua mencit diperlakukan dengan cara yang seragam dan ditempatkan dalam kandang yang sesuai, dengan pengaturan suhu sekitar 10°C. Pencahayaan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Selama periode penelitian, kebutuhan makan dan minum mencit senantiasa dipantau untuk memastikan kesehatan mereka tetap terjaga.

D. Jalannya Penelitian

1. Uji kaji etik

Tahapan awal studi ini yaitu menjalankan pengajuan permohonan uji kelaikan etik (*Ethical Approval*). Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit putih jantan sehingga memerlukan

Ethical Clearance yang di dapatkan di Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta Jawa Tengah.

2. Determinasi tanaman mangga arum manis

Penentuan identitas tanaman adalah proses pengenalan tanaman dengan menganalisis ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis yang terdapat pada pucuk daun mangga arumanis. Proses identifikasi ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Tradisional (B2P2TOOT) yang terletak di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

3. Pengumpulan, pengeringan dan pembuatan serbuk

Daun pucuk mangga arum manis yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Sukoharjo, Jawa Tengah, dengan total berat 17 kg. Proses persiapan dimulai dengan membersihkan daun dari kotoran menggunakan air mengalir hingga bersih, kemudian ditiriskan dan diletakkan di atas kertas untuk menghilangkan sisa air, selanjutnya daun dikeringkan di dalam oven pada suhu 45°C selama 150 menit. Setelah proses pengeringan selesai, daun yang telah kering dihaluskan dengan cara diblender, lalu disaring menggunakan saringan mesh 40. Proses terakhir, bubuk daun yang dihasilkan ditimbang untuk proses selanjutnya (Kemenkes RI, 2011).

4. Uji susut pengeringan

Pengurangan berat bahan setelah proses pengeringan disebut sebagai susut pengeringan. Penentuan nilai susut pengeringan menggunakan metode gravimetri. Proses dimulai dengan menimbang 10 g sampel, yang kemudian ditempatkan dalam wadah yang sudah ditimbang sebelumnya. Sampel dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam, lalu ditimbang. Pemanasan dilanjutkan dan penimbangan dilakukan setiap jam hingga perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak melebihi 0,25% (Kemenkes RI, 2017).

5. Pembuatan ekstrak pucuk daun mangga arum manis

Ekstraksi etanol dari pucuk daun mangga arum manis dimulai dengan menyiapkan daun yang telah dihancurkan, kemudian menimbang sebanyak 600 g untuk dimasukkan ke dalam maserator. Daun tersebut direndam menggunakan 6 liter pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10 selama 6 jam, sambil sesekali diaduk, setelah itu rendaman didiamkan selama 18 jam. Proses filtrasi

dilakukan untuk memisahkan maserat, menggunakan kain kasa dan pelarut etanol yang sama, dengan dua kali penyaringan tambahan menggunakan 3 liter pelarut. Hasil filtrasi kemudian dikumpulkan dan diuapkan menggunakan *rotary vacuum* evaporator pada suhu 40°C dan tekanan 1 mBar, diikuti dengan penggunaan *water bath* pada suhu 70°C untuk menguapkan sisa pelarut hingga terbentuk ekstrak yang kental (Kemenkes RI, 2017).

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat}}{\text{bobot simplisia yang diekstrak}} \times 100\%$$

6. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak pucuk daun mangga arum manis

Kadar air ditentukan dengan memanfaatkan alat *Sterling Bidwell* dan pelarut berupa toluen jenuh air. Batas maksimum kadar air yang diperbolehkan pada serbuk simplisia adalah 10%. Kadar air yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan pada kandungan simplisia, yang disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme (Supriningrum *et al.*, 2019). Cara yang dilakukan dalam penetapan kadar air yaitu dengan menyiapkan toluen jenuh air terlebih dahulu. Pembuatan toluen jenuh air dilakukan dengan cara menggojog sejumlah toluen sebanyak 200 mL dalam 10 mL *aquadest* lalu dibiarkan memisah dan lapisan airnya dibuang. Serbuk pucuk daun mangga arum manis ditimbang sebanyak 20 g, sedangkan ekstrak pucuk daun mangga arum manis ditimbang sebanyak 2 g lalu di masukan ke dalam labu alas bulat lalu ditambahkan dengan 200 mL toluen jenuh air kemudian dipasangkan alatnya. Tahap selanjutnya dipanaskan dengan api kecil selama 30 menit. Pemanasan dihentikan apabila dalam penampung sudah tidak ada lagi air yang menetes, setelah itu kadar air diukur kemudian persen kadar airnya dihitung dalam satuan persen dengan rumus sebagai berikut (Kemenkes RI, 2017).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca (ml)}}{\text{Berat bahan (g)}} \times 100\%$$

7. Identifikasi kandungan senyawa

7.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak etanol dari pucuk daun mangga arum manis dilarutkan menggunakan etanol, lalu diaplikasikan ke plat silika GF 254 dengan eluasi menggunakan campuran kloroform-metanol (9:1, v/v). Noda yang terbentuk, yang

muncul setelah diberi uap amonia dan menunjukkan perubahan warna menjadi kuning atau kuning-cokelat, menandakan adanya senyawa flavonoid (Marliana, 2016).

7.2 Identifikasi tanin. Ekstrak etanol dari pucuk daun mangga arum manis dilarutkan dalam etanol dan kemudian diterapkan pada plat silika GF 254. Fase gerak yang digunakan adalah campuran n-butanol-asam asetat (9:1) v/v. Untuk mendeteksi bercak, digunakan pereaksi semprot FeCl_3 . Hasil dianggap positif apabila terbentuk warna kehitaman saat diperiksa di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm (Hayati *et al.*, 2012).

7.3 Identifikasi saponin. Ekstrak etanol dari pucuk daun mangga arum manis dilarutkan dalam etanol, lalu diaplikasikan pada plat silika GF 254. Plat tersebut selanjutnya ditempatkan dalam ruang yang berisi campuran eluen kloroform-metanol (17:3) v/v. Pengamatan visualisasi bercak digunakan pereaksi semprot *Liebermann-Burchard*. Hasil yang dianggap positif ditandai dengan terbentuknya warna biru hingga violet, meskipun terkadang bercak yang muncul berwarna merah, kuning, biru tua, ungu, hijau, atau cokelat kekuningan saat diamati di bawah sinar tampak (Wagner & Bladt, 1996).

7.4 Identifikasi alkaloid. Ekstrak etanol dari pucuk daun mangga arum manis dicampurkan dengan etanol dan diaplikasikan pada pelat silika GF 254, setelah itu pelat dimasukkan ke dalam ruang pengelusi yang berisi campuran kloroform dan etil asetat (dengan perbandingan 6:4 v/v). Proses elusi selesai lalu pelat dikeringkan, kemudian diamati menggunakan cahaya UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Pengujian untuk mendeteksi adanya alkaloid, pelat KLT disemprot dengan pereaksi *Dragendorff*, dan warna coklat atau jingga yang muncul menunjukkan keberadaan alkaloid (Marliana, 2016).

7.5 Identifikasi terpenoid. Pengujian terpenoid dilakukan dengan meneteskan ekstrak etanol dari pucuk daun mangga arum manis pada plat KLT yang dilapisi silika gel F 254. Fase geraknya menggunakan campuran n-butanol dan etil asetat dengan perbandingan 12:8 (v/v), kemudian sampel dianalisis di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm. Setelah itu, sampel disemprotkan dengan pereaksi *Liebermann-Burchard*. Hasil uji

dianggap positif apabila muncul bercak berwarna merah coklat yang juga menunjukkan fluoresensi hijau (Widyaningsih *et al.*, 2016).

8. Penentuan dosis

8.1 Penentuan dosis aloksan. Dosis aloksan yang digunakan untuk membuat mencit diabetes adalah 4 mg /kg bb secara intraperitoneal (Sujono & Sutrisna, 2010). Mencit yang digunakan adalah mencit yang memiliki berat sekitar 20 g, sehingga didapatkan dosis aloksan yang digunakan pada penelitian ini adalah 0,08 mg/20 g berat badan mencit (Maharani *et al.*, 2018).

9. Pembuatan sediaan uji

9.1 Aloksan monohidrat. Sebanyak 1 gram aloksan monohidrat dilarutkan dalam 100 ml larutan garam fisiologi untuk membuat larutan dengan konsentrasi 1%. Larutan ini kemudian digunakan sebagai induktor diabetes (Maharani *et al.*, 2018).

9.2 CMC Na 0,5%. Penelitian ini menggunakan kontrol negatif yaitu larutan CMC Na 0,5%. Pembuatan 0,5 g CMC Na 0,5% dilarutkan secara bertahap dalam aquadest hangat, lalu campuran tersebut dimasukkan ke dalam mortir dan digerus hingga halus, setelah itu, sisa aquadest ditambahkan hingga volume total mencapai 100 ml, kemudian diaduk hingga merata (Nafila *et al.*, 2013).

9.3 Larutan garam fisiologis. Larutan fisiologis 0,9% dibuat dengan cara melarutkan 0,9 g NaCl dalam air suling pada volume 100 ml dibuat untuk melarutkan aloksan monohidrat (Indasari *et al.*, 2018).

10. Perlakuan hewan uji

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini ditimbang dan diberi tanda untuk identifikasi. Sebelum memulai perlakuan, dilakukan proses adaptasi selama satu minggu agar mencit dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan baru. Hewan uji yang dipilih adalah mencit putih jantan dengan berat tubuh rata-rata sekitar 20 gram. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 25 ekor yang secara acak dibagi dalam 5 kelompok :

Kelompok 1 : Kontrol normal (hanya diberi makan dan minum)

Kelompok 2 : Kontrol negatif, mencit diberikan CMC Na 0,5%

Kelompok 3 : Ekstrak etanol 70% pucuk daun mangga arumanis
52,5mg /Kg BB

Kelompok 4 : Ekstrak etanol 70% pucuk daun mangga arumanis
105mg/Kg BB

Kelompok 5 : Ekstrak etanol 70% pucuk daun mangga arumanis
210mg/Kg BB

11. Prosedur uji diabetes aloksan dan kontrol berat badan mencit

Mencit putih jantan berumur dua hingga tiga bulan dengan berat badan rata-rata 20 gram dibagi menjadi enam kelompok dan dipuasakan selama 18 jam. Hari pertama sebelum perlakuan, mencit diambil darahnya untuk diukur kadar glukosa awal (T0). Kontrol berat badan mencit dilakukan sebelum dan sesudah diinduksi. Tujuan dari kontrol berat badan mencit yaitu agar bisa mengamati apakah berbagai variasi kontrol dan ekstrak pucuk daun mangga arum manis dapat menyebabkan perubahan berat badan seperti terjadi penurunan ataupun kenaikan. Mencit kemudian diberikan larutan aloksan 4 mg/kg bb secara intraperitoneal pada hari yang sama, setelah diinduksi aloksan, masing-masing hewan uji dengan kadar glukosa darah >200 mg/dl dibagi menjadi beberapa kelompok dan diambil darahnya pada hari pertama (T1) untuk diukur kadar glukosa darahnya.

Darah diambil masing-masing kelompok diberi suspensi CMC Na 0,5% (kelompok 2, kontrol negatif), dan ekstraksi etanol 70% pucuk daun mangga arum manis dengan dosis suspensi yang berbeda (kelompok 3, 4 dan 5) diberikan setiap pagi hari selama 14 hari. Kelompok normal hanya mendapat makanan dan minuman (kelompok 1). Pengukuran KGD dilakukan sehabis mencit puasa 18 jam (T0), setelah diberikan aloksan (T1), setelah mencit diabetes diberikan perlakuan hari ke 7 (T2), dan hari ke 14 (T3) memakai alat glucometer *easy touch*. Penimbangan berat badan setelah diberikan perlakuan dilakukan bersamaan dengan pengukuran kadar gula darah.

12. Penetapan kadar glukosa darah

Pengukuran kadar gula darah menggunakan metode glukometer (*glucometer easy touch*). Sebagian kecil sampel darah, sekitar 1 μ L, diambil dari mencit dan ditempatkan pada strip tes, setelah darah mengisi strip, perangkat secara otomatis memulai pengukuran kadar glukosa darah, dengan darah yang mengalir ke

dalam strip melalui proses kapiler. Glukosa yang ada dalam darah bereaksi dengan glukosa oksidase dan kalium *ferrocyanide* yang terkandung dalam strip, menghasilkan kalium *ferrocyanide*. Jumlah kalium *ferrocyanide* yang terbentuk berbanding lurus dengan kadar glukosa dalam darah. Proses oksidasi kalium *ferrocyanide* menghasilkan muatan listrik yang kemudian diubah oleh glukometer, menampilkan hasil pengukuran konsentrasi glukosa pada layar.

13. Pemeriksaan histopatologi.

Preparat jaringan pankreas diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dan pengukuran dilakukan menggunakan milimeter block untuk setiap ekor mencit. Wilayah yang dianalisis adalah area sinar, yaitu lokasi distribusi sel-sel endokrin yang membentuk kelompok tersendiri yang dikenal sebagai pulau *Langerhans*, lalu dilakukan penghitungan terhadap diameter sel endokrin yang terdapat pada pankreas mencit (Utami, 2019)

Hewan coba dibius menggunakan kloroform, lalu hati dan pankreasnya diambil sepenuhnya. Jaringan pankreas yang telah difiksasi dalam larutan formalin 10% dan dilapisi parafin kemudian digunakan untuk pemeriksaan mikroskopis mengikuti prosedur laboratorium standar.

13.1 Pengambilan organ pankreas. Hewan percobaan dianestesiakan terlebih dahulu sebelum akhirnya pankreas mereka diambil secara keseluruhan. Selanjutnya, jaringan pankreas tersebut diproses untuk dibuat sebagai preparat histopatologi.

13.2 Fraksi dan dehidrasi jaringan. Proses rendemen organ dilakukan dengan memanfaatkan larutan formalin 10%, sementara rendemen jaringan yang telah difiksasi diolah dengan memasukkan jaringan tersebut ke dalam larutan alkohol secara bertahap.

13.3 Clearing jaringan. Tahapan *clearing* atau pembersihan bertujuan untuk menghapus alkohol dari jaringan, mengingat alkohol dan parafin tidak dapat bercampur. Hal ini memungkinkan larutan yang akan digunakan untuk memasuki jaringan dan berikatan dengan parafin. Proses ini dilakukan dengan menggunakan larutan xylene untuk menghilangkan alkohol (dealkoholisasi). Langkah pertama adalah merendam jaringan pankreas dalam xylene I selama 30 menit, kemudian melanjutkan dengan xylene II selama 90 menit, dan terakhir, merendam dalam xylene III selama 90 menit.

13.4 Pembuatan blok paraffin. Proses yang mempermudah pemotongan jaringan, proses pemadatan dilakukan dengan membenamkan jaringan ke dalam paraffin selama satu jam. Tahap pembedahan jika telah selesai, dilanjutkan dengan pengecoran (*bloking*). Caranya adalah dengan perlahan menuangkan paraffin cair di sekitar pinggir jaringan untuk mencegah kebocoran, kemudian posisikan jaringan sesuai dengan orientasi yang diinginkan saat proses pemotongan (agar permukaan jaringan rata di dasar), setelah itu tuangkan paraffin cukup banyak hingga jaringan tertutup sepenuhnya. Pastikan tidak ada gelembung udara yang terbentuk, dan biarkan seluruhnya mengeras selama 12 jam.

13.5 Pengirisan jaringan. Letakkan pisau mikrotom pada sudut yang telah ditentukan, lalu pasang blok paraffin yang akan dipotong pada holder menggunakan spatula atau pisau bedah yang dipanaskan. Tempatkan holder dengan preparat pada mikrotom dan atur ketebalan irisan antara 5-10 μm . Pastikan preparat yang terpasang di holder mendekati ke pisau. Gerakkan mikrotom secara ritmis, buang paraffin yang tidak mengandung jaringan, dan setelah pisau mengenai jaringan, potong blok preparat dengan hati-hati. Pindahkan preparat menggunakan penjepit ke dalam waterbath yang telah dipanaskan pada suhu 55°C, agar pita paraffin mengembang dengan baik. Tempelkan pita paraffin yang telah dipotong pada kaca objek yang sudah diolesi albumin, dengan cara menurunkan kaca objek secara vertikal ke dalam waterbath. Pastikan agar potongan jaringan yang akan diamati berada di tengah kaca objek. Biarkan kaca objek dengan potongan jaringan paraffin tersebut selama 12 jam.

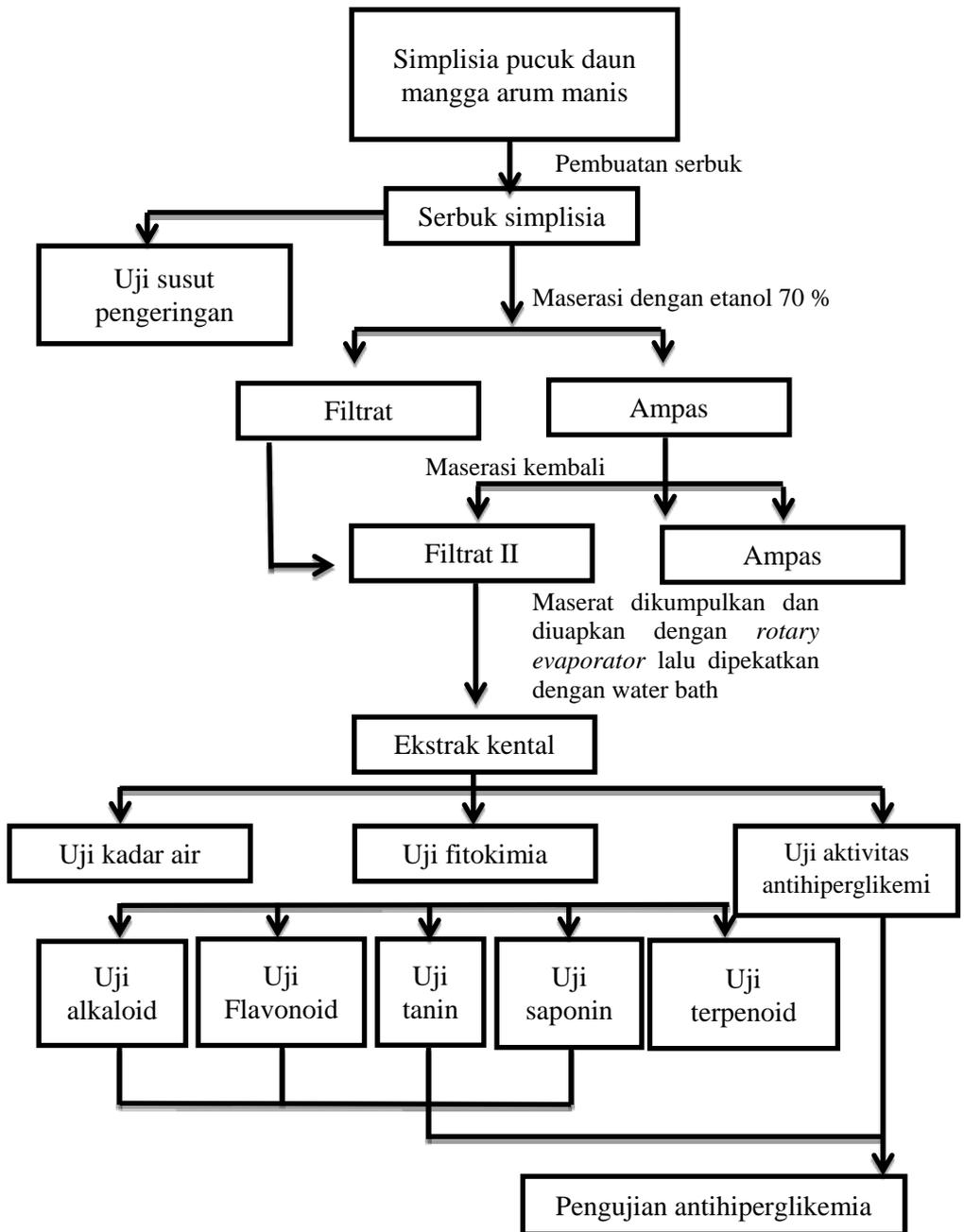
13.6 Pewarnaan jaringan. Pewarnaan jaringan dilakukan untuk mempermudah identifikasi jaringan saat diperiksa dengan mikroskop. Sementara itu, pengujian histopatologi dilakukan menggunakan teknik pewarnaan HE.

13.7 Pengamatan jaringan dengan mikroskop. Tahapan terakhir adalah dengan melakukan observasi di bawah mikroskop dan optilab untuk menganalisis hasil seperti menghitung jumlah, skala, dan pengukuran jarak serta keterangan pada gambar sehingga didapatkan hasil yang jelas dan dapat dipertanggungjawabkan.

E. Analisa Statistik

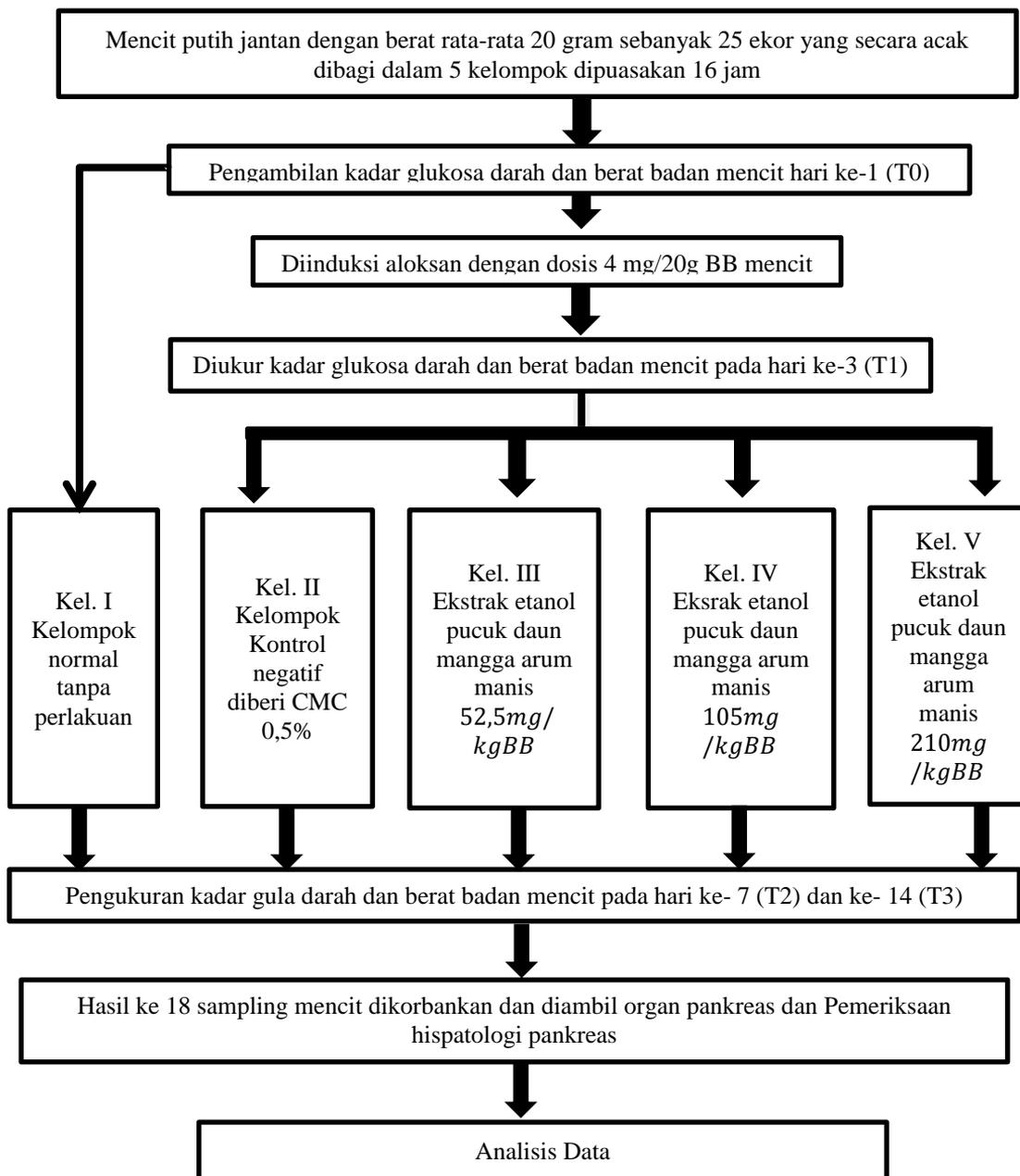
Analisa data yang diperoleh pada penelitian ini di analisis secara statistik untuk mengetahui dosis yang efektif dalam penurunan kadar glukosa darah yang diperoleh. Data T0-T1, T1-T2, dan T1-T3 diuji dengan *Wilcoxon* (untuk melihat adanya perbedaan antara pasca induksi dan pasca perlakuan) apabila data terindikasi tidak normal (sig. $<0,05$). Data *delta T* (T1-T2) dan (T1-T3) baik pada kadar gula darah maupun berat badan serta persentase nekrosis dilakukan uji pendahuluan normalitas dan homogenitas, jika data terdistribusi tidak normal dan homogen ($p>0,05$) maka pengujian lanjutan dilakukan menggunakan *one way anova* dan *Tukey*, namun apabila data tidak terdistribusi normal atau tidak homogen (sig. $<0,05$) maka uji dilanjutkan menggunakan *post hoc dunnett t3* untuk mengetahui signifikansi antar sampel uji.

F. Skema Pembuatan Ekstrak



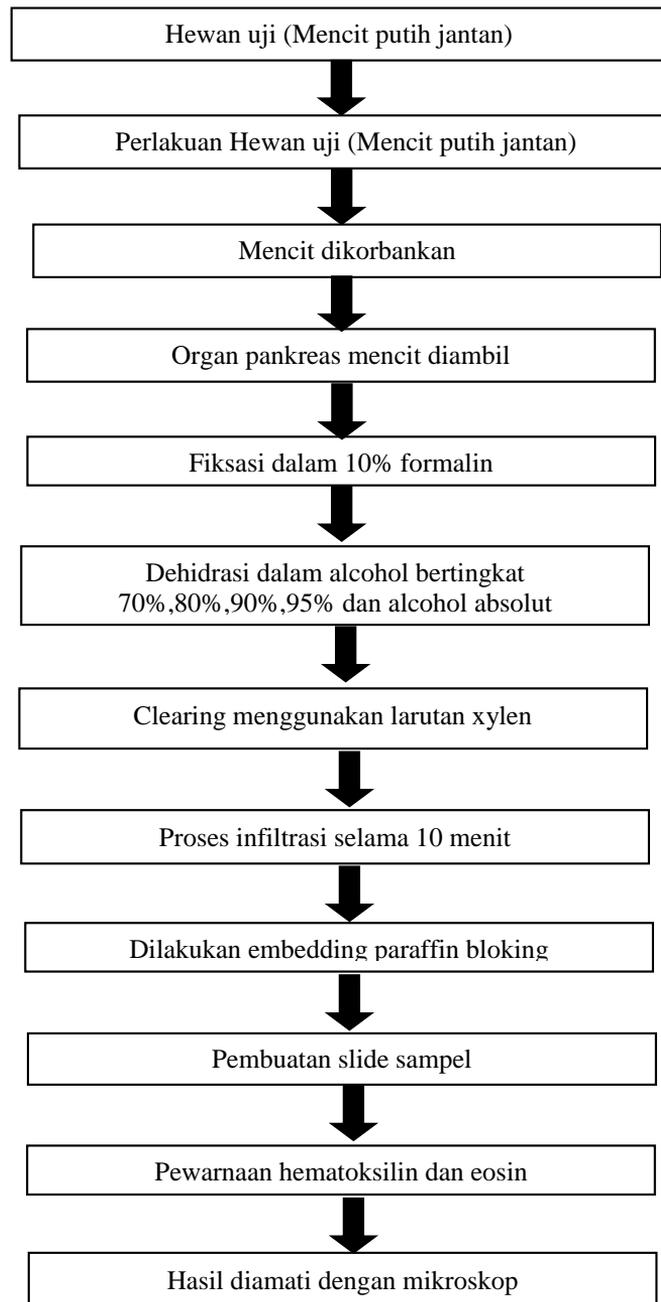
Gambar 6. Skema penelitian secara umum.

G. Alur Uji Aktivitas Antihiperqlikemia



Gambar 7. Alur uji aktivitas antihiperqlikemia.

H. Skema Preparat Histologi Pankreas



Gambar 8. Skema preparat histologi pankreas.