

## **BAB III METODE PENELITIAN**

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

#### **1. Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun labu siam yang diambil dari Tawamunggu, Solo Jawa Tengah.

#### **2. Sampel**

Sampel merupakan bagian dari suatu populasi. Sampel pada penelitian ini adalah daun labu siam (*Sechium edule (Jacq.) Swartz*) yang masih segar, tidak terkena serangan hama dan telah dicuci bersih dengan air mengalir setelah itu dikeringkan.

### **B. Varian Penelitian**

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

Variabel utama dalam penelitian ini adalah efek aktivitas ekstrak daun labu siam dalam menurunkan kadar gula darah pada tikus diabetes yang telah diinduksi aloksan, dengan variasi dosis 42 mg, 84 mg, dan 168 mg.

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

Variabel utama yang ditetapkan dalam klasifikasi ke macam-macam variabel yaitu :

**2.1. Variabel bebas.** Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah untuk mengamati dampaknya terhadap variabel terikat. Pada penelitian ini, variabel bebas adalah ekstrak daun labu siam yang diberikan dengan dosis yang berbeda-beda.

**2.2. Variabel tergantung.** Dalam penelitian ini, variabel tergantung adalah variabel utama yang menunjukkan hasil atau respons dari perlakuan yang diberikan. Dalam kasus ini, variabel tergantung adalah penurunan kadar glukosa darah pada tikus galur Wistar yang telah menerima berbagai perlakuan.

**2.3. Variabel terkontrol.** Variabel terkontrol adalah variabel yang dapat memengaruhi variabel tergantung, sehingga harus dikendalikan agar hasil penelitian konsisten dan dapat direplikasi oleh peneliti lain. Dalam penelitian ini, variabel terkontrol meliputi umur, berat badan, jenis kelamin, galur hewan uji, kondisi lingkungan laboratorium, serta prosedur dan kondisi penelitian..

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, sampel daun labu siam adalah daun yang diambil saat keadaan segar, dan bebas dari hama yang didapatkan dari daerah Tawamangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, Serbuk daun labu siam adalah hasil dari daun labu siam yang dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C, kemudian digiling menjadi serbuk halus dan disaring menggunakan pengayak dengan ukuran mesh no 40.

Ketiga, Ekstrak daun labu siam diperoleh dengan cara merendam daun labu siam dalam pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi.

Keempat, glibenklamid adalah obat diabetes oral, sediaan dengan dosis 5 mg.

Kelima, glukometer menggunakan strip uji yang dimasukkan ke dalam alat, di mana darah ditetaskan ke zona reaksi pada strip uji untuk melakukan pengukuran kadar glukosa.

Keenam, peningkatan dan penurunan kadar glukosa darah hewan uji sebelum dan sesudah perlakuan.

Ketujuh, gambaran histopatologi hati tikus galur wistar yang mengalami diabetes setelah diberi perlakuan.

Kedelapan, nekrosis adalah kematian sel atau jaringan akibat proses degenerasi yang reversible. Nekrosis terdapat 3 bentuk yaitu, pignotik, karioereksis, dan kariolisis.

Kesembilan, pignotik adalah mengecilnya inti sel berwarna gelap (basofilik) dan sitoplasma sel menjadi kemerahan.

Kesepuluh, karioereksis adalah sel mengecil, kontur sel iregular, fragmentasi inti sel menjadi beberapa bagian kecil.

Kesebelas, kariolisis adalah menghilangnya inti sel.

## **C. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol daun labu siam dalam penelitian ini terdiri dari, alat penggiling, oven, ayakan mesh 40, bejana maserasi, corong glass, kain flannel, gelas ukur, beaker glass, erlenmeyer, mikropipet, timbangan bahan, batang pengaduk, rotary evaporator, alat sentrifugasi, labu fotometer.

## 2. Bahan

**2.1. Bahan sampel.** Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun labu siam yang didapatkan di daerah Tawamangu, Solo Jawa Tengah.

**2.2. Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan meliputi etanol 96% sebagai pelarut atau cairan pengencer. Untuk pengamatan histopatologi, bahan yang digunakan termasuk Formalin PA (formalin pekat), larutan pewarna Haematoxylin Eosin, formaldehid, etanol, toluen, dan alkohol. Selain itu, dalam penelitian ini juga digunakan glibenklamid dan aloksan sebagai agen farmakologis yang menjadi fokus pengujian.

**2.3. Hewan uji.** Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus galur wistar yang berusia 2-3 bulan dengan berat 180-220 gram.

## D. Alur Penelitian

### 1. Determinasi tanaman

Tujuan determinasi adalah memverifikasi keautentikan simplisia berdasarkan observasi makroskopis dan mikroskopis dengan menggunakan referensi dari literatur sebagai panduan.

### 2. Pengambilan bahan

Daun labu siam diambil dari tanaman labu siam yang diperoleh dari daerah Tawamangu, Solo Jawa Tengah. Daun labu siam dipilih yang masih dalam keadaan segar dan bagus serta tidak terserang hama.

### 3. Pembuatan serbuk daun labu siam

Daun labu siam yang dijadikan sampel penelitian dipilah dengan proses sortasi basah untuk membersihkan daun dari kotoran yang ada. Setelah sortasi basah, sampel daun dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Daun yang sudah bersih kemudian dikeringkan dengan bantuan paparan sinar matahari. Setelah kering, daun tersebut dihaluskan dengan blender untuk mendapatkan serbuk sebagai sampel akhir.

### 4. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*, serbuk daun labu siam ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian diukur kehilangan air dan bobotnya. Penetapan susut pengeringan dilakukan tiga kali dengan waktu pengukuran selama 4 menit untuk satu kali pengukuran. Ditunggu sampai muncul angka dalam satuan persen (%) lalu dicatat sebagai hasil penetapan susut

pengeringan. Kadar air memiliki syarat yaitu jika kadar air dalam sebuah simplisia kurang dari 10% (Depkes, 2013).

#### **5. Pembuatan ekstrak etanol daun labu siam**

Ekstraksi etanol dari daun labu siam dilakukan dengan metode maserasi. Dalam proses ini, 500 gram serbuk daun labu siam (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz) ditimbang dan dicampur dengan 5 liter pelarut etanol 96% dalam sebuah bejana yang terlindung dari cahaya matahari. Bejana ditutup rapat dan dibiarkan selama 2 hari dengan sesekali diaduk. Setelah itu, ekstrak disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan residu. Residu yang tersisa kemudian dimaserasi kembali dengan sisa pelarut yang sama dan didiamkan selama 1 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 1 hari, dilakukan penyaringan lagi untuk mendapatkan filtrat kedua dan residu kedua. Filtrat dari kedua proses ini kemudian digabungkan dan dipisahkan dengan menggunakan evaporator pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak yang kental (Depkes RI, 1986).

#### **6. Penetapan kadar air serbuk daun labu siam**

Penetapan kadar air bertujuan untuk menentukan kisaran atau batas maksimal dari jumlah air yang terdapat dalam bahan. Hal ini penting untuk menilai kemurnian dan keberadaan kontaminan pada simplisia yang digunakan. Metode yang digunakan adalah gravimetri, di mana sekitar 10 gram sampel ditimbang dengan teliti dan ditempatkan dalam wadah yang telah ditimbang terlebih dahulu. Sampel kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama lima jam, lalu ditimbang kembali. Proses pengeringan dilanjutkan dengan penimbangan setiap satu jam hingga selisih antara dua penimbangan berturut-turut tidak melebihi 0,25%.

#### **7. Identifikasi kandungan senyawa**

**7.1. Identifikasi flavonoid.** Ekstrak etanol daun labu siam sebanyak 2 gram ditambahkan aquadest panas sebanyak 20 ml kemudian dipanaskan selama 5 menit diatas penangas air panas kemudian disaring. Untuk mengidentifikasi, 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg, 1 ml HCl pekat, dan 2 ml amil alkohol. Kemudian dicampur dan dibiarkan terpisah. Lapisan amil alkohol mengalami warna merah, kuning, atau jingga, yang menunjukkan bahwa itu mengandung flavonoid (Marjoni & Saifuddin, 2022).

**7.2. Identifikasi tannin.** Sampel sebanyak 0,5 gram diekstrak dengan 10 ml aquadest. Hasil ekstraksi disaring, lalu filtratnya

diencerkan dengan aqudest sampai tidak lagi berwarna. Hasil pengenceran diambil 2 ml, kemudian ditambahkan 1-2 tetes pereaksi larutan besi (III) klorida. Positif mengandung tanin apabila terjadi warna biru atau hijau kehitaman (Marjoni & Saifuddin, 2022).

**7.3. Identifikasi saponin.** Dalam tabung reaksi, 0,5 gram ekstrak daun labu siam ditambahkan dengan 10 mililiter air suling panas. Kemudian didinginkan dan dikocok dengan kuat selama 10 detik hingga terbentuk buih atau busa. Selama minimal 10 menit dengan ketinggian 1–10 cm, busa tidak hilang ketika ditetaskan HCl 2N, yang menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung saponin (Marjoni & Saifuddin, 2022).

## 8. Penetapan dosis

**8.1. Dosis glibenklamid.** Dosis glibenklamid yang diadaptasi dari dosis manusia dengan berat badan 70 kg untuk digunakan pada tikus berat badan 200 gram adalah 0,09 mg. Perhitungan ini menggunakan faktor konversi sebesar 0,018 dari dosis manusia ke tikus ( $0,018 \times 5$  mg).

**8.2. Dosis aloksan.** Dosis aloksan yang diberikan kepada tikus adalah 150 mg per kilogram berat badan (BB) tikus, sesuai dengan studi yang dilakukan oleh Yanto et al. (2016). Untuk menghitung dosis yang sesuai berdasarkan tabel konversi dosis oleh Ngatidjan (1991), aloksan dihitung berdasarkan berat badan standar tikus, yaitu 200 gram. Hal ini dihitung sebagai berikut:  $(200 \text{ gram} / 1000 \text{ gram}) \times 150 \text{ mg/kgBB} = 30$  mg per 200 gram berat badan tikus. Kemudian, aloksan monohidrat sebanyak 30 mg ditimbang dan larutkan dalam 10 mL NaCl 0,9% yang dingin (Prasetyo & Safitri, 2016).

**8.3. Dosis ekstrak etanol labu siam.** Dosis ekstrak etanol daun labu siam pada penelitian ini berdasarkan penelitian Kurniawan dkk, (2017) yakni dosis ekstrak labu siam 84 mg/kgBB tikus sebagai efek antidiabetes. Dosis penelitian ditentukan dengan orientasi  $\frac{1}{2}$  DE, 1 DE dan 2 DE, sehingga dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah 42 mg/kgBB, 84 mg/kgBB dan 168 mg/kgBB tikus.

**8.4. Larutan aloksan 1%.** Larutan aloksan 1 adalah larutan yang digunakan untuk menginduksi diabetes. Untuk membuatnya, serbuk aloksan seberat 1 gram larut dalam larutan NaCl 0,9% hingga mencapai volume 100 ml.

**8.5. Larutan CMC Na 0,5%.** Untuk membuat larutan CMC Na 0,5%, CMC Na sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam sekitar 30 ml aquadest panas, yang sebelumnya didiamkan selama 15 menit untuk

membentuk larutan koloidal dengan pengadukan. Kemudian, ditambahkan aquades hingga mencapai volume 100 ml (Togubu et al., 2013).

**8.6. Glibenklamid.** Glibenklamid sebanyak 5 mg dilarutkan dalam larutan CMC Na 0,5% hingga mencapai volume 100 ml untuk membuat suspensi.

## **9. Pemberian larutan uji**

Tikus diinduksi dengan aloksan melalui injeksi intraperitoneal dengan dosis yang disesuaikan berdasarkan berat badan. Setelah induksi, kadar glukosa darah diperiksa 72 jam kemudian. Kondisi hiperglikemia pada tikus ditetapkan jika kadar glukosa darah mencapai atau melebihi 200 mg/dL (Prameswari & Widjanarko, 2014). Sebagai perbandingan, dalam kelompok kontrol positif, tikus menerima larutan glibenklamid secara oral, sementara kelompok kontrol negatif menerima larutan Na CMC 0,5%. Kelompok perlakuan menerima larutan ekstrak etanol daun labu siam, juga diberikan secara oral, dengan dosis yang telah ditentukan (Dewi et al., 2016; Nangoy et al., 2019).

## **10. Persiapan hewan uji**

Pada penelitian ini hewan uji yang digunakan adalah tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) umur 2-3 bulan dengan berat 180-220 gram. Sebanyak 30 ekor tikus diaklimatisasi selama 1 minggu. Sebelum dilakukan pengukuran glukosa darah dan berat badan awal tikus dipuaskan selama 16-18 jam dengan tetap diberi minum (Bintang Bella Pertiwi et al., 2021).

## **11. Perlakuan dan pengelompokan hewan uji**

Tikus galur wistar berusia dua hingga tiga bulan dengan berat antara 180 dan 220 gram digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian ini. Tiga puluh tikus ini diaklimatisasi selama satu minggu untuk membiasakan diri dengan kondisi percobaan dan mengontrol kesehatan mereka. Hewan uji dibagi menjadi enam kelompok secara acak dan diberi makan dan minum selama dua belas hingga enam belas jam. Berikut adalah kelompok penelitian:

Kelompok 1 : Kelompok normal tanpa perlakuan.

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

Kelompok 3 : Kontrol positif, tikus diberikan glibenklamid 45 mg/kgBB

Kelompok 4 : Ekstrak etanol daun labu siam dosis 42 mg/kgBB

Kelompok 5 : Ekstrak etanol daun labu siam dosis 84 mg/kgBB

Kelompok 6 : Ekstrak etanol daun labu siam dosis 168 mg/kgBB

## **12. Pengukuran kadar glukosa darah tikus**

Pengukuran kadar glukosa darah tikus dilakukan dengan menggunakan alat fotometer.

**12.1 Fotometer.** Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan kemudian darah disentrifugasi untuk memisahkan serum dan plasma darah. Pengambilan sampel darah melalui vena orbitalis. Selanjutnya, tiga tabung reaksi yang telah diberi label (blanko, standar, dan sampel) dibuat dan diisi dengan 1000 µl reagen kerja. Selanjutnya, 10 µl reagen standar ditambahkan ke tabung baku dan 10 µl sampel ditambahkan ke tabung sampel. Setelah itu, sampel dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit di suhu 20-25°C. Hasilnya dilihat pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm. Mikropipet berujung biru digunakan untuk mengambil reagen 1000 µL, dan mikropipet berujung putih digunakan untuk mengambil serum, larutan santadar, dan aquadest 10 µL.

## **13. Prosedur membedah hewan uji**

Hewan uji dalam penelitian ini yang akan dijadikan preparat adalah dua ekor tikus dari enam kelompok perlakuan, sehingga jumlah tikus yang akan dibedah berjumlah dua belas ekor. Prosedur pembedahan dilakukan dengan tikus diletakkan di atas pelat bedah dengan bantuan jarum. Pembedahan dimulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok, kemudian organ pankreas diangkat. Setelah diangkat, pankreas dibersihkan dari lemak yang menempel dan dicuci berulang kali dengan larutan NaCl 0,9%. Organ yang telah dicuci kemudian ditempatkan dalam wadah berisi larutan formalin 4-10% dan buffer formalin untuk proses fiksasi.

## **14. Prosedur pembuatan preparat histopatologi pankreas**

Pembuatan preparat histopatologi jaringan hewan, menyiapkan jaringan segar dalam pengamatan mikroskopis, fiksasi, dehidrasi, clearing, embedding, pemotongan jaringan (cutting), dan pewarnaan atau staining. Metode pembuatan preparat menggunakan pewarnaan haematoksisilin eosin (HE). Haematoksisilin berwarna biru, bekerja sebagai pelarut basa yang berfungsi untuk memberikan warna pada inti sel atau unsur basofilik jaringan, xylene digunakan untuk membersihkan paraffin. Eosin yang berwarna merah memiliki sifat asam bertujuan untuk mewarnai sitoplasma, dan rehidrasi menggunakan alkohol 96% - 70% sebagai penghantar untuk proses pewarnaan dengan HE. Jika

prosedur ini tidak dilakukan maka akan sulit melakukan pengamatan di bawah mikroskop (Rizki et al., 2015).

### **15. Perhitungan kerusakan sel organ pankreas**

Penentuan dosis yang efektif untuk kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dilakukan dengan menilai tingkat kerusakan pada sel-sel pankreas. Penilaian ini melibatkan pemeriksaan jumlah pulau Langerhans pada setiap bidang penglihatan untuk mengamati dampak negatif dari zat diabetogenik yang masuk. Persentase kerusakan pankreas dihitung berdasarkan total inti sel juga jumlah inti sel yang mengalami nekrosis, seperti pignotik, karioreksis, dan kariolisis. Hasil perhitungan ini yang akan menunjukkan sejauh mana perlakuan memengaruhi persentase nekrosis organ pankreas.

$$\text{Presentase nekrosis} = \frac{\text{total inti sel yang mengalami nekrosis}}{\text{total inti sel pankreas}} \times 100\%$$

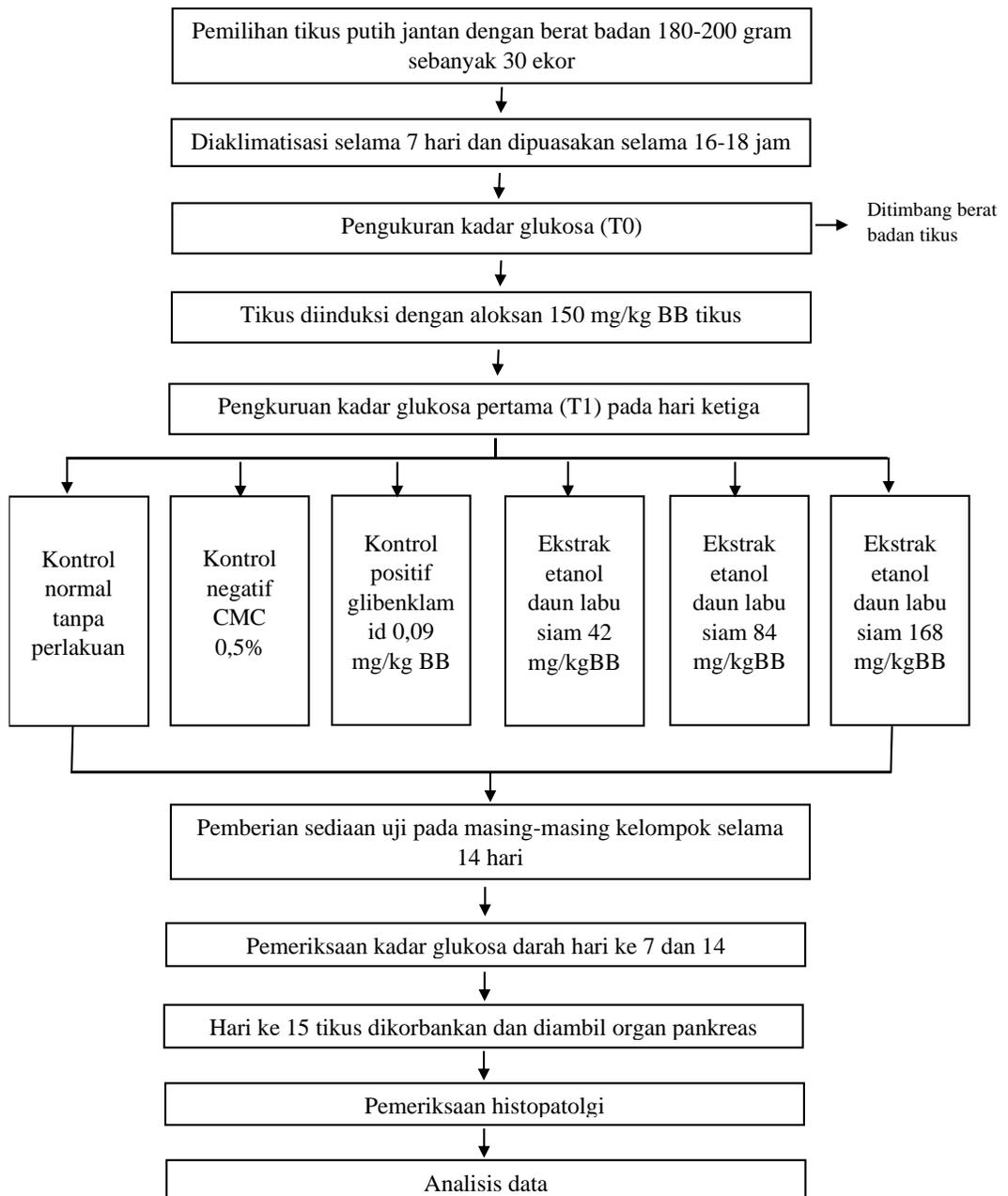
Kerusakan organ pankreas dapat diketahui dengan mengamati dan menghitung jumlah inti sel yang mengalami nekrosis, seperti piknosis, karioreksis, dan kariolisis. Data yang didapat bersifat kualitatif dan kemudian diubah menjadi data kuantitatif melalui pemberian skor. Skor 0 diberikan jika tidak ada kerusakan (normal), skor 1 untuk adanya piknosis, skor 2 untuk karioreksis, dan skor 3 untuk kariolisis. Semakin tinggi skor yang diperoleh, semakin besar tingkat kerusakan pankreas, sedangkan skor yang lebih rendah menunjukkan adanya perbaikan kondisi pankreas.

### **E. Analisis Data**

Analisis data dalam penelitian ini dilakukan secara statistik untuk menentukan dosis paling efektif sebagai antidiabetes dalam menurunkan kadar glukosa darah. Langkah awal yaitu uji distribusi normal menggunakan metode *Shapiro-Wilk*. Data dianggap terdistribusi secara normal jika  $p > 0,05$ , sedangkan jika  $p < 0,05$ , data dianggap tidak terdistribusi secara normal. Jika data terdistribusi normal, langkah selanjutnya adalah uji homogenitas varian untuk mengevaluasi kesamaan varian. Varian dianggap homogen jika  $p > 0,05$ , dan tidak homogen jika  $p < 0,05$ . Setelah itu, analisis kadar glukosa darah dilakukan menggunakan uji *One Way ANOVA* untuk menentukan apakah terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Nilai  $p < 0,05$  menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok. Jika ditemukan perbedaan signifikan, analisis dilanjutkan dengan uji *Tukey*

*post hoc* untuk mengidentifikasi kelompok mana yang memiliki perbedaan tersebut.

### F. Skema Penelitian



**Gambar 5. Skema Penelitian**