

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun lamtoro yang diambil dari Tawamangu, Solo, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun lamtoro (*Leucaena leucocephala* L.).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah aktivitas ekstrak etanol yang dilanjutkan ke tahap fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun lamtoro sebagai antidiabetes dan gambaran histopatologi organ pankreas pada mencit jantan yang diinduksi aloksan.

2. Klasifikasi variabel utama

Semua variabel yang menjadi subjek penelitian dapat langsung diidentifikasi dalam variabel utama. Pertama, variabel utama yang diteliti dipilih dan dapat dikategorikan lebih lanjut sebagai variabel bebas, variabel tergantung, variabel terkendali. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah untuk mempelajari pengaruh terhadap variabel tergantung. Variabel tergantung merupakan parameter yang digunakan sebagai inti persoalan dari penelitian. Variabel terkendali merupakan variabel yang berdampak pada variabel tergantung, ditentukan untuk memberikan hasil yang konsisten dan didapatkan direproduksi oleh penelitian.

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dosis fraksi *n*-heksana, dosis fraksi etil asetat, dan dosis fraksi air.

Variabel tergantung dalam penelitian ini ialah penurunan kadar gula darah dan kondisi organ pankreas pada mencit jantan setelah mendapatkan masing-masing perlakuan.

Variabel terkendali dalam penelitian ini ialah berat badan, usia, jenis kelamin, kondisi penelitian, kondisi laboratorium, dan proses tahap fraksinasi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun lamtoro dengan kondisi segar, berwarna hijau, dan tidak rusak diperoleh dari daerah Tawamangu, Solo, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun lamtoro adalah serbuk yang dihasilkan dari proses pengambilan daun lamtoro, pencucian, pengeringan dengan bantuan oven bersuhu 40⁰C, kemudian simplisia daun lamtoro yang telah kering dihaluskan menggunakan blender, kemudian diayak dengan ayakan no. 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun lamtoro merupakan hasil ekstraksi serbuk daun lamtoro dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi.

Keempat, fraksi *n*-heksana merupakan fraksi dari ekstrak etanol 96% daun lamtoro yang difraksinasi dengan menggunakan pelarut *n*-heksana yang merupakan pelarut non polar. Fraksi etil asetat adalah fraksi dari ekstrak etanol daun lamtoro yang difraksinasi menggunakan pelarut etil asetat sebagai pelarut semi polar. Fraksi air merupakan sisa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun lamtoro yang diuapkan dengan menggunakan penangas air.

Kelima, mencit putih yang berumur 2-3 bulan dengan BB 20-40 gram yang diinduksi menggunakan aloksan dengan dosis 70 mg/kg BB mencit sehingga menyebabkan mencit mengalami diabetes.

Keenam, glibenklamid merupakan obat diabetes oral dengan dosis pada sediaan adalah 5 mg.

Ketujuh, keadaan histopatologi organ pankreas menunjukkan peningkatan sel beta dan penurunan proporsi nekrosis sel pulau Langerhans terhadap jumlah total sel normal. Beberapa jenis kerusakan nekrosis yaitu nekrosis koagulatif, nekrosis cair (*colliquativa*), nekrosis kaseosa, nekrosis lemak, dan nekrosis fibroid.

Kedelapan, dosis efektif adalah dosis dari fraksi ekstrak etanol daun lamtoro yang memiliki efektivitas sebagai antidiabetes.

C. Alat, Bahan, dan Hewan Uji

1. Alat

Alat untuk maserasi terdiri dari blender, timbangan bahan, ayakan mesh no. 4, oven, kertas saring, botol atau wadah gelap, batang pengaduk, kain flanel, corong, evaporator, dan *waterbath*. Alat untuk fraksinasi terdiri dari gelas ukur, corong pisah, *waterbath*, timbangan, dan evaporator. Alat yang digunakan dalam perlakuan hewan uji adalah jarum oral, timbangan, spuit injeksi, gelas ukur, kandang mencit, dan beaker glass. Alat yang digunakan dalam mengukur penurunan glukosa darah mencit adalah glucometer dengan merek *Gluko Dr.* alat yang digunakan untuk preparat histopatologi adalah rangkaian alat bedah

scalpel, pisau, pinset, jarum, meja lilin, gunting, mikrotom putar, deck glass, *object glass*, dan mikroskop cahaya Olimphus CH20.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini ialah serbuk kering daun lamtoro yang didapat dari daerah Tawamangu, Solo, Jawa Tengah dengan melewati proses ekstraksi menggunakan etanol 96% serta pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan air untuk tahap fraksinasi.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini ialah glibenklamid, CMC-Na, etanol 96%, aquadest, aloksan, NaCl. Untuk penetapan kadar glukosa darah menggunakan stik gluco dr. Sementara bahan untuk pengamatan histopatologi menggunakan larutan warna Haematoxylin Eosin, etanol, formaldehid, alcohol, xylen, dan formalin PA. Dan bahan untuk identifikasi senyawa tanaman menggunakan pereaksi HCl 2N, magnesium, HCl Pekat, kloroform, aquadest, H₂SO₄, dan FeCl₃.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini ialah mencit putih jantan yang sehat dengan berat badan kurang lebih 20-40 gram, kisaran berumur 2-3 bulan sebanyak 30 ekor yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi (USB).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman lamtoro

Tujuan dari determinasi ini adalah untuk memverifikasi keakuratan karakteristik makroskopis dan mikroskopis tanaman. Hal ini dilakukan dengan membandingkan ciri-ciri morfologi tanaman pada literatur dengan hasil analisis yang dilakukan di

2. Pengumpulan, pengeringan, dan pembuatan serbuk

Sampel yang digunakan adalah daun lamtoro yang berasal dari daerah Tawamangu, Solo, Jawa Tengah. Setelah dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran atau debu yang tersisa, daun lamtoro ditiriskan dan dijemur di dalam oven. Selanjutnya, dilakukan proses sortasi kering diikuti dengan proses blender dan pengayakan dengan ayakan no. 40 untuk mendapatkan serbuk daun lamtoro sesuai yang dibutuhkan (Kemenkes, 2017).

3. Penetapan kadar air daun lamtoro

Kadar air daun lamtoro diukur dengan menggunakan metode gravimetri dengan cara menimbang 10 gram sampel dan

memasukkannya ke dalam wadah yang telah ditara. Keringkan sampel selama lima jam pada suhu 105°C, kemudian timbang kembali dan keringkan kembali hingga perbedaan antara kedua timbangan tidak melebihi dari 0,25% (FHI, 2017).

4. Pembuatan ekstrak etanol daun lamtoro

Dengan menggunakan proses maserasi, serbuk simplisia daun lamtoro diekstraksi. Sebanyak 500 gram simplisia daun lamtoro dimasukkan ke dalam bejana atau botol kaca berwarna gelap. Kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 5000 ml, dan wadah ditutup. Kemudian dibiarkan selama 6 jam sambil sesekali dikocok. Setelah 6 jam pertama selanjutnya diamkan selama 18 jam. Penyarian dapat dilakukan dua kali dengan pelarut yang sama, dengan volume pelarut setengah dari ekstrak pertama. Maserat disaring untuk memisahkan filtrat dari ampas dengan menggunakan kain flanel. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan dengan rotary evaporator suhu 50°C. Persentase rendemen ekstrak kemudian dihitung (Kemenkes, 2017)

5. Pembuatan fraksi

Ekstrak daun lamtoro seberat 10 g dilarutkan dalam 10 ml etanol, dicampur dengan 75 ml aquadest, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 75 ml *n*-heksana dan dipartisi sebanyak 6 kali sampai warna pelarutnya hilang. Fraksi *n*-heksana diperoleh dengan menimbang fraksinasi setelah dipekatkan dalam oven pada suhu 50°C.

Residu dari fraksinasi *n*-heksana dimasukkan kedalam corong pisah kemudian ditambahkan 75 ml etil asetat lalu dipartisi sebanyak 3 kali hingga warna pelarut menghilang. Hasil filtrat dipekatkan menggunakan oven pada suhu 50°C. Selanjutnya hasil ditimbang yang kemudian disebut sebagai fraksi etil asetat.

Residu yang berasal dari fraksi etil asetat dipekatkan dengan *waterbath* pada suhu kurang lebih 50°C. Selanjutnya hasil ditimbang yang kemudian disebut sebagai fraksi air (Kemenkes, 2017)

6. Identifikasi kandungan senyawa

6.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak etanol daun lamtoro dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahi 0,1 gram bubuk magnesium (Mg), ditambah 2 sampai 3 tetes HCl, dan 1 ml amil alkohol. Campuran tersebut kemudian dikocok, diamkan beberapa saat hingga memisah. Terciptannya warna kuning, merah atau jingga pada lapisan amil alkohol menandakan hasil positif (Bhayu 2020).

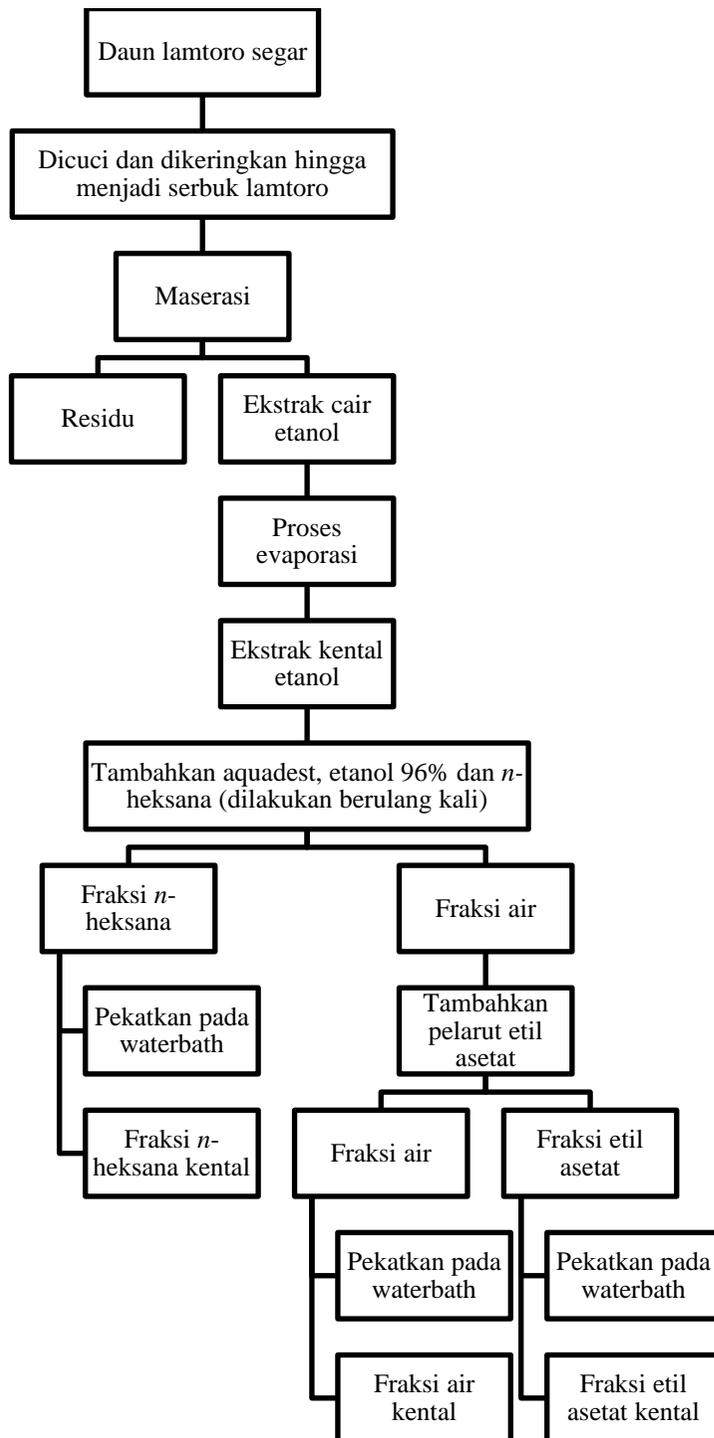
6.2 Identifikasi saponin. Ekstrak daun lamtoro seberat 0,5 g ditambahkan ke dalam tabung reaksi bersama dengan \pm 10 ml air panas dan dikocok kuat. Kemudian tambahkan 1 tetes HCl 2N, jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm dan tidak hilang, maka ini menunjukkan reaksi positif saponin (Bhayu 2020).

6.3 Identifikasi alkaloid. Untuk mengidentifikasi alkaloid menggunakan metode Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Tambahkan 9 ml aquadest, 1 ml HCl 2N, dan 0,5 g ekstrak daun lamtoro. Kemudian di panaskan selama 2 menit, didinginkan, lalu disaring. Selanjutnya filtrat dibagi menjadi 3 bagian, 1 bagian dengan masing-masing pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Tiga bagian warna yang berbeda pada pereaksi Mayer menunjukkan hasil positif untuk alkaloid terbentuk endapan putih, hasil positif pereaksi Wagner terbentuk endapan warna coklat kemerahan, dan hasil positif pereaksi Dragendorff terbentuk endapan warna orange atau jingga (Bhayu 2020).

6.4 Identifikasi tanin. Ekstrak daun lamtoro dicampur dengan \pm 20 ml air mendidih, dididihkan selama 15 menit, kemudian dibiarkan dingin sebelum disaring. Tambahkan filtrat 5 ml ke dalam tabung reaksi dengan tambahkan beberapa tetes pereaksi larutan FeCl_3 1%. Hasil positif tanin ditandai dengan terbentuk warna hijau violet (Ergina *et al.* 2014)

6.5 Identifikasi steroid. Sampel dilarutkan dengan aquadest 2 ml diuapkan dalam cawan porselen. Residu yang diperoleh dilarutkan dengan 0,5 ml kloroform, lalu ditambahkan 0,5 ml asam asetat anhidrat, kemudian tambahkan 2 ml asam sulfat pekat (HCl) melalui dinding tabung. Hasil positif steroid ditandai dengan muncul cincin biru kehijauan atau cincin hijau kehitaman (Bhayu 2020).

6.6 Identifikasi terpenoid. Sampel dilarutkan dengan aquadest 2 ml diuapkan dalam cawan porselin. Residu yang diperoleh dilarutkan dengan 0,5 ml kloroform, lalu di tambahkan 0,5 ml asam asetat anhidrat, selanjutnya tambahkan 2 ml asam sulfat pekat (HCl) melalui dinding tabung. Hasil positif terpenoid ditandai dengan cincin kecoklatan atau violet atau hijau kehitaman (Bhayu 2020).



Gambar 5. Pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun lamtoro

7. Penentuan dosis

7.1 Penentuan dosis aloksan. Dosis aloksan yang digunakan untuk membuat mencit diabetes adalah 70 mg/kg BB secara intraperitoneal (Hikmah dkk 2016).

7.2 Penentuan dosis glibenklamid. Dosis glibenklamid berdasarkan Katzung (2012) yaitu dosis awal yang direkomendasikan adalah 2,5-5 mg sekali sehari, yang dapat ditingkatkan setiap bulan hingga maksimum 10 mg 2 kali sehari.

8. Pembuatan sediaan uji

8.1 Aloksan. Larutan aloksan dengan konsentrasi 1% dibuat dengan melarutkan 1 gram aloksan ke dalam larutan garam pada volume 100 ml. penggunaan aloksan bertujuan sebagai penginduksi diabetes pada mencit.

8.2 Pembuatan larutan garam fisiologis. Larutan garam fisiologis 0,9% dibuat dengan menimbang 0,9 gram NaCl ke dalam air suling pada volume 100 ml yang digunakan untuk melarutkan aloksan (Indasari 2018).

8.3 Na CMC 0,5%. Na CMC 0,5% dibuat dengan melarutkan 0,5 gram CMC Na 0,5% menggunakan aquadest hangat (dituang sedikit demi sedikit), selanjutnya masukkan ke dalam mortir lalu digerus halus. Kemudian, tambahkan aquadest ad 100 ml dan aduk (Togubu dkk 2019).

9. Perlakuan hewan uji

Hewan uji mencit ditimbang lalu diberi label tanda. Mencit tersebut dibiarkan menyesuaikan diri dengan lingkungannya selama satu minggu terlebih dahulu sebelum diberi perlakuan uji. Mencit putih jantan yang digunakan untuk pengujian memiliki berat antara 20-40 gram. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 30 ekor yang dibagi ke dalam 6 kelompok sebagai berikut:

Kelompok 1 : Kontrol positif (diberi glibenklamid)

Kelompok 2 : Kontrol negatif (diberi Na CMC 0,5%)

Kelompok 3 : Ekstrak etanol daun lamtoro dosis 150 mg/kg BB

Kelompok 4 : Fraksi *n*-heksana daun lamtoro dosis 60 mg/kg BB

Kelompok 5 : Fraksi etil asetat daun lamtoro dosis 30 mg/kg BB

Kelompok 6 : Fraksi air daun lamtoro dosis 75 mg/kg BB

10. Prosedur uji diabetes aloksan

Dalam penelitian ini hewan uji yang digunakan sebanyak 30 ekor mencit. Yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing terdiri dari 5 ekor. Hewan uji diberi minum dan makan selama

16 jam. Setelah itu, darah diambil dari vena ekor mencit untuk menentukan kadar glukosa darah puasa awal (T_0). Semua hewan uji kemudian diberikan dosis 70 mg/kg BB aloksan untuk menginduksi diabetes. Kadar glukosa darah hewan uji dinilai sekali lagi pada hari ke-3 untuk menilai dampak hiperglikemia yang terjadi. Setelah positif hiperglikemia, setiap hewan uji menerima perlakuan berdasarkan kelompok uji (Hikmah *et al.* 2016). Dosis glibenklamid, kelompok uji ekstrak etanol 96% dosis 150 mg/kg BB, kelompok uji fraksi *n*-heksana dosis 60 mg/kg BB, kelompok uji fraksi etil asetat dosis 30 mg/kg BB, kelompok uji fraksi air dosis 75 mg/kg BB mencit. Jika kadar glukosa darah mencit lebih dari 140 mg/dL, maka mencit tersebut dianggap mengalami hiperglikemia (Putra *et al.* 2015).

11. Pengambilan lewat sampel

Di akhir penelitian, hewan uji di bunuh dan organ-organnya diambil untuk menentukan berat organ dan persen indeks organ. Hewan uji dibunuh dengan cara memutus otak melalui leher. Dengan menggunakan alat tajam untuk memutuskan saraf tulang belakang hewan uji.

12. Pembuatan preparat histopatologi hewan uji

Organ-organ pankreas mencit yang telah dipotong dikeluarkan dan ditempatkan dalam wadah plastik. Agar preparat tidak cepat rusak, organ-organ tersebut segera difiksasi dengan formalin PA 10% dan diberikan tanda label pada pot kode mencit sesuai dengan kelompok perlakuan uji. Selanjutnya, potongan jaringan yang berisi organ pankreas yang telah difiksasi dibedah dan direndam dalam air mengalir selama setengah jam.

Setelah pengambilan, sampel jaringan diawetkan dengan formalin 10%. Setelah menghilangkan air dari jaringan (dehidrasi), jaringan dibersihkan dengan xylol (*clearing*) dan kemudian ditanamkan dalam parafin. Proses ini dilakukan dengan menggunakan alkohol dengan konsentrasi mulai 70% hingga 95%. Selanjutnya, mikrotom berukuran 5 μ digunakan untuk memotong (*section*) jaringan yang telah tertanam dalam blok parafin. Sediaan kemudian diinkubasi di atas *hot place* yang dipanaskan pada suhu 50⁰C selama 15 menit setelah blok yang telah dipotong diletakkan di atas kata objek yang telah diberi nomor registrasi blok (Dwielma *et al.* 2015).

Selanjutnya dilakukan tahap pewarnaan hematoxylin eosin. Tahap deparafinisasi melibatkan pencelupan ke dalam larutan xylol I, II, dan III masing-masing selama 3 menit. Untuk tahap rehidrasi

alkohol 100%, alkohol 95%, alkohol 80%, dan alkohol 70% digunakan selama 2 menit. Sediaan kemudian direndam dalam Harri's Hematoxylin selama 10 menit dengan air mengalir. Perendaman dalam eosin selama 10 menit, diikuti dengan dehidrasi dengan etanol bertingkat dari 70% hingga absolut, dan kemudian dibersihkan dengan xylol I,II, dan III. Setelah prosedur pewarnaan selesai, sediaan diolesi dengan perekat, ditutupi dengan kaca penutup, dan diawetkan (Dwielma *et al.* 2015).

13. Derajat Penilaian Kerusakan Organ Pankreas Mencit

Kerusakan pankreas pada mencit diperbaiki dengan mencari kerusakan jaringan pada preparat histologi pankreas mencit pada semua kelompok perlakuan, dan kemudian menilai tingkat kerusakannya (Dharma dkk 2015).

Berdasarkan hasil penilaian histologi organ pankreas terhadap masing-masing kelompok hewan uji untuk batas sel Langerhans, nekrosis, jumlah sel, dan bentuk sel tidak normal. Nekrosis sebagian besar mempengaruhi nukleus. Ini terdiri dari tiga desain yaitu:

- Piknosis : Secara khusus, inti menyusut, menghasilkan homogenitas sitoplasma dan peningkatan eosinophil, dengan DNA yang terkondensasi menjadi massa yang menyusut.
- Karyoreksis : Inti terfragmentasi, terpecah menjadi beberapa bagian, yang bersifat piknotik.
- Karyolisis : Aktivitas DNase menyebabkan kromatin basofil memudar.

Sistem penilaian kerusakan organ pankreas yang digunakan dalam penelitian ini adalah sistem skoring sebagai berikut :

- Skor 0 : Batas organ, jumlah sel, bentuk sel nekrosis, dan pulau Langerhans semuanya normal
- Skor 1 : Terdiri dari batas sel yang berbeda, penurunan jumlah sel, tidak adanya sel nekrotik hanya degenerasi, dan bentuk sel yang teratur (kerusakan $\frac{1}{4}$ bagian sel)
- Skor 2 : Degenerasi sel, bentuk sel yang tidak teratur, dan penurunan jumlah sel, dan batas sel yang mulai berbeda terlihat mulai tidak jelas (kerusakan $\frac{1}{2}$ bagian sel)
- Skor 3 : Bentuk sel yang menyimpang, sel nekrotik yang jelas, jumlah sel yang lebih sedikit secara keseluruhan, dan batas sel yang kabur (kerusakan $\frac{3}{4}$ bagian sel)

Skor 4 : Hampir semua sel mengalami nekrosis, bentuk sel tidak beraturan, jumlah sel jauh lebih sedikit, dan batas sel sangat kabur.

14. Histopatologi pankreas hewan uji yang diinduksi aloksan

Area pulau Langerhans yang tidak terdefinisi tampak memiliki celah kosong dan menunjukkan nekrosis dan degenerasi yang ditandai dengan piknosis pada inti sel. Adanya celah kosong pada bagian tengah pulau Langerhans merupakan indikasi terjadinya nekrosis dan degenerasi pada daerah tersebut. Menurut Prameswari dan Widjanarko (2019) nekrosis sel beta menjadi penyebab adanya area kosong pada pulau Langerhans.

Menurut Vessal dkk (2021) sel beta membentuk 60% dari perkembangan pulau Langerhans, oleh karena itu kerusakan pada banyak sel beta akan mengakibatkan pengurangan diameter sel pulau Langerhans. Wilayah pulau Langerhans menunjukkan piknosis dan kariolisis inti sel, serta hubungan sel asinar yang jelas dengan pulau Langerhans yang longgar. Menurut Kanter dkk (2023) nekrosis menyebabkan warna gelap pada beberapa inti sel piknosis dengan sitoplasma eosinofilik yang menyebabkan koagulasi nekrosis.

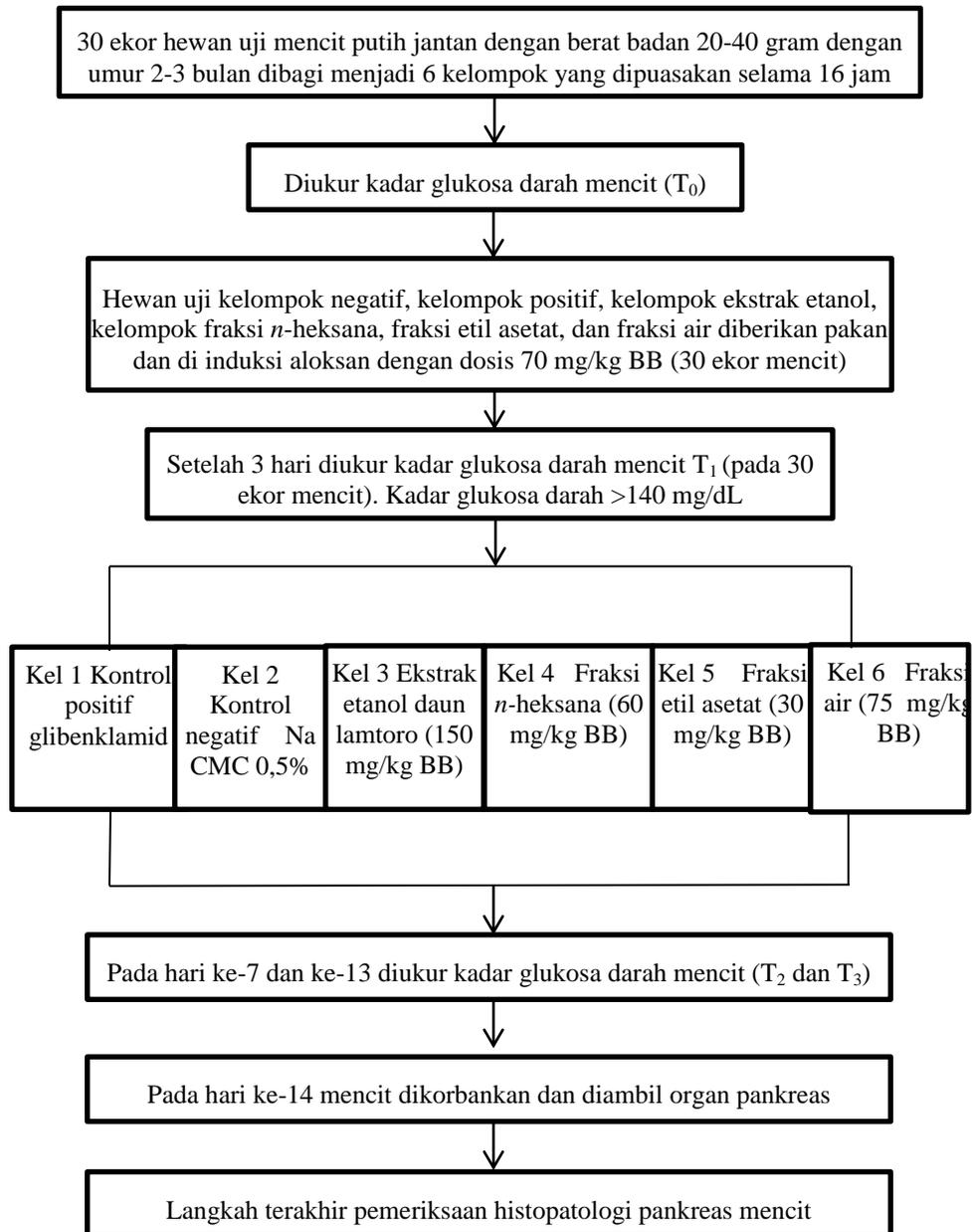
15. Perlakuan hewan uji setelah bedah

Setelah penelitian selesai dan organ tubuh hewan uji diambil, jasad hewan uji dikuburkan di dalam lubang yang digali sedalam minimal setengah meter agar tempat penguburannya tidak mudah dibongkar. Hewan uji dikuburkan ditempat yang telah ditentukan atau disediakan.

16. Pemeriksaan histopatologi

Untuk menentukan lokasi kerusakan jaringan yang dimaksud dan untuk menginterpretasikan parameter perubahan histologis pada jaringan pankreas dalam preparat uji dilakukan dengan menggunakan mikroskop Olympus BX41 dan perangkat lunak Olympus DP2-BSW Yang diambil pada perbesaran 1000x.

Skema Alur Penelitian



Gambar 6. Skema Alur Penelitian

E. Analisis Data

Analisis data untuk penelitian ini dibuat berdasarkan data yang terkumpul. Dengan menggunakan analisis data statistik, uji Saphiro-wilk dapat digunakan untuk memastikan apakah data yang terkumpul terdistribusi normal atau tidak. Jika data terdistribusi normal, maka uji

dilakukan dengan *Measured repeat test*. Untuk melihat korelasi variabel bebas (berat badan dengan gula darah mencit) antar waktu pengujian. Selain itu, data juga didukung dengan uji Post hoc tukey apabila data didapati berbeda signifikan $<0,05$. Pengujian statistik menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistics 25.