

## **BAB III METODE PENELITIAN**

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

#### **1. Populasi**

Populasi adalah semua objek yang digunakan dalam penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun tanaman ranti (*Solanum nigrum* L.) yang berada di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

#### **2. Sampel**

Sampel adalah bagian terkecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun tanaman ranti (*Solanum nigrum* L.) yang masih dalam keadaan segar, berwarna hijau dan bersih dari kotoran, tidak terkena serangan hama diambil dari tanaman ranti yang tumbuh di daerah Tawangmangu.

### **B. Variabel Penelitian**

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

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun ranti (*Solanum nigrum* L.). Variabel utama kedua yaitu aktivitas penurunan kadar glukosa darah dan perbaikan histopatologi pankreas pada tikus yang diinduksi aloksan. Variabel utama ketiga yaitu tikus putih Jantan galur wistar dengan berat badan 180-200 gram.

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

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk melihat pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi dosis ekstrak etanol daun ranti (*Solanum nigrum* L.).

Variabel tergantung adalah titik permasalahan yang disebabkan oleh variabel utama. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah penurunan kadar glukosa darah tikus putih jantan galur wistar setelah pemberian ekstrak etanol daun ranti yang dibuat dalam berbagai dosis.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dianggap memengaruhi variabel tergantung. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah

metode ekstraksi daun ranti, kondisi hewan uji, kondisi laboratorium, ketepatan dosis, proses pengujian antidiabetes, dan praktikan.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, sampel daun ranti adalah daun tanaman ranti yang masih segar, berwarna hijau cerah, masih muda, dan tidak terkena serangan hama yang diambil dari tanaman ranti yang tumbuh di daerah Tawangmangu.

Kedua, serbuk daun ranti adalah serbuk yang berasal dari daun ranti yang telah dikeringkan dengan oven suhu 50°C kemudian dibuat serbuk dengan diayak menggunakan ayakan ukuran mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun ranti adalah ekstrak kental yang diperoleh dari hasil ekstraksi daun ranti dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode maserasi kemudian dipekatkan dengan *vacuum evaporator*.

Keempat, aloksan adalah bahan yang diberikan pada hewan uji secara intraperitoneal dengan tujuan merusak sel  $\beta$  pankreas pulau Langerhans yang berfungsi menghasilkan insulin sehingga hewan uji mengalami diabetes.

Kelima, kadar glukosa darah adalah kadar glukosa darah yang diambil melalui *sinus orbitalis* tikus putih jantan dan ditetapkan dengan alat spektrofotometri menggunakan metode GOD-PAP.

Keenam, hiperglikemia adalah keadaan terjadi peningkatan kadar glukosa dalam darah melebihi batas normal.

Ketujuh, diabetes adalah kondisi dimana hewan uji memiliki kadar glukosa darah yang tinggi sebesar >200 mg/dL.

Kedelapan, gambaran histopatologi pankreas adalah hasil pengamatan histopatologi menggunakan mikroskop dengan teknik *Hematoxylin Eosin* (HE) pada tikus yang diabetes setelah diberikan perlakuan.

Kesembilan, nekrosis adalah kematian sel atau jaringan akibat proses degenerasi yang reversibel.

Kesepuluh, piknotik adalah mengecilnya inti sel berwarna gelap dan sitoplasma sel menjadi kemerahan.

Kesebelas, karioreksis adalah mengecilnya sel, kontur sel ireguler, fragmentasi inti sel menjadi beberapa bagian kecil.

Keduabelas, kariolisis adalah menghilangnya inti sel.

Ketigabelas, dosis efektif adalah dosis optimal dari ekstrak etanol daun ranti yang dapat menurunkan kadar gula darah setara dengan kontrol positif.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gilingan, ayakan mesh 40, oven dengan suhu rendah dan konstan untuk membuat simplisia. Alat penyari yang digunakan adalah timbangan analitik, seperangkat alat maserasi, botol gelap, *vacuum rotary evaporator*, batang pengaduk, kain flannel, tabung reaksi, beaker glass, pipet, kertas saring, labu takar, gelas ukur, dan erlenmeyer. Alat yang digunakan untuk penetapan susut pengeringan adalah *moisture balance*. Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji adalah kandang tikus, timbangan analitik, spuit injeksi, jarum oral, dan gelas ukur. Alat yang digunakan untuk mengukur kadar glukosa darah adalah instrument spektrofotometer, mikro pipet 10  $\mu\text{L}$  dan 1000  $\mu\text{L}$ , tabung reaksi, rak tabung reaksi, sentrifuge, spuit 3 mL, waterbath, stopwatch, tip kuning, tip biru, tip putih, tisu, dan kapas alkohol. Alat yang digunakan untuk pemeriksaan histopatologi adalah serangkaian alat bedah (pisau, pinset, scalpel, jarum, gunting, dan meja lilin), *rotary microtome*, mikroskop cahaya Olimpus CH20, *object glass*, dan *deck glass*.

### 2. Bahan

**2.1 Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ranti (*Solanum nigrum* L.) berwarna hijau cerah yang didapatkan dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

**2.2 Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70% sebagai pelarut penyari. Bahan yang digunakan untuk uji farmakologi adalah glibenklamid, CMC-Na, aloksan, NaCl 0,9%, dan aquadest. Bahan yang digunakan untuk pengamatan histopatologi adalah larutan warna *Hematoxylin Eosin*, formalin PA, alkohol, *xylene*, etanol, dan formaldehid. Bahan yang digunakan untuk pengukuran kadar glukosa darah adalah sampel serum dan plasma EDTA, satu kit reagen glukosa, dan reagen GOD-PAP + *buffer*.

### 3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar yang memiliki berat badan 180-200 gram dan berusia

2-3 bulan sebanyak 30 ekor yang diperoleh dari laboratorium farmakologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

#### **D. Jalannya Penelitian**

##### **1. Determinasi daun ranti**

Determinasi tanaman merupakan tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini. Determinasi daun ranti bertujuan untuk menentukan kebenaran sampel daun ranti berdasarkan dari ciri-ciri morfologi secara makroskopis dari tanaman ranti dengan kunci determinasi. Determinasi tanaman dilakukan di Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional (B2P2TOOT).

##### **2. Pengambilan sampel**

Sampel daun ranti dalam penelitian ini diambil dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun ranti diambil dalam keadaan segar, masih muda, tidak busuk, dan bebas dari hama.

##### **3. Pembuatan serbuk daun ranti**

Daun ranti segar dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran atau debu yang melekat pada daun, kemudian daun ditiriskan dan dilakukan pengeringan dengan oven pada suhu 40°C selama beberapa hari sampai kering. Daun yang telah kering dipotong-potong menjadi kecil untuk memudahkan simplisia dihaluskan dengan menggunakan mesin gilingan, selanjutnya simplisia diayak menggunakan ayakan mesh 40.

##### **4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun ranti**

Untuk mengetahui susut pengeringan serbuk daun ranti digunakan alat *moisture balance*. Proses pengeringan melibatkan penempatan sampel dalam wadah pengering dan suhunya 105°C hingga tercapai berat yang konsisten. Penentuan susut pengeringan dilakukan dengan menimbang 2 g bubuk daun ranti ke dalam cawan, kemudian dimasukkan ke dalam *moisture balance* untuk mengukur dan mencatat susutnya (Utami *et al.*, 2017).

##### **5. Pembuatan ekstrak etanol daun ranti**

Pembuatan ekstrak etanol daun ranti dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk daun ranti ditimbang sebanyak 800 gram, kemudian masukkan kedalam botol coklat dan rendam dengan 8000 mL etanol 96% (1:10). Botol coklat didiamkan selama 24 jam sambil diaduk beberapa kali pada 6 jam pertama kemudian didiamkan selama 18 jam. Hasil ekstraksi kemudian disaring dengan kain flannel. Proses penyarian

diulangi sekurang-kurangnya sebanyak satu kali dengan cara yang sama yaitu ampas ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 4000 mL. Filtrat dikumpulkan lalu uapkan dengan penguap *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Setelah itu, hitung rendemen yang diperoleh antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan data penimbangan (Kemenkes RI, 2013).

## **6. Penetapan kadar air ekstrak etanol daun ranti**

Penetapan kadar air bertujuan untuk melihat batasan maksimal dan rentang dari besarnya kandungan air dalam bahan. Kadar air ekstrak memiliki persyaratan kurang dari 10%, sehingga dapat mencegah terjadinya penurunan mutu ekstrak karena reaksi enzimatik. Penetapan kadar air ekstrak etanol daun ranti dilakukan dengan menimbang ekstrak sebanyak 10 gram, kemudian dimasukkan ke dalam kurs porselen lalu dikeringkan pada suhu 105 °C selama 5 jam dan ditimbang ulang. Digunakan suhu rendah 105°C untuk menjaga agar kadar air stabil dan waktu 5 jam sebagai waktu penyusutan kadar air maksimal. Kadar air yang tinggi dapat menyebabkan mudahnya kapang, khamir, dan bakteri berkembang biak.

## **7. Uji bebas etanol ekstrak daun ranti**

Untuk mengetahui adanya etanol pada ekstrak daun Ranti dilakukan uji bebas etanol menggunakan esterifikasi alkohol. Dalam tabung reaksi, ekstrak daun Ranti dicampur dengan asam asetat dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, kemudian dipanaskan. Jika tidak terdeteksi aroma ester atau etil asetat, hal ini menunjukkan tidak adanya etanol (Vifta, 2020).

## **8. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun ranti**

Identifikasi kandungan kimia pada ekstrak daun ranti dilakukan secara kualitatif. Tujuan dilakukan identifikasi adalah untuk mengetahui kebenaran zat aktif kandungan kimia pada daun ranti yang dipercaya mempunyai aktivitas antidiabetes. Senyawa yang diidentifikasi adalah alkaloid, flavonoid, saponin, tanin.

**8.1 Identifikasi alkaloid.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun ranti ditambahkan HCL 1% lalu saring. Filtrat yang dihasilkan dibagi menjadi dua bagian dan lakukan pengujian dengan beberapa tetes pereaksi *dragendroff* dan *mayer*. Hasil identifikasi akan menunjukkan positif alkaloid bila terbentuk warna coklat muda atau endapan jingga pada penambahan pereaksi *dragendroff*. Terbentuk endapan putih atau kuning pada penambahan pereaksi *mayer* (Kumoro, 2015).

**8.2 Identifikasi flavonoid.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun ranti masukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 2 mL etanol 96%, 0,1 gram serbuk Mg, dan 2 mL HCl 2N. Larutan dikocok dan ditambahkan 1 ml amil alkohol. Hasil identifikasi akan menunjukkan positif flavonoid bila terbentuk warna merah atau kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Tiwari *et al.*, 2011).

**8.3 Identifikasi saponin.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun ranti masukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan akuades sampai sampel terlarut homogen, kemudian dididihkan selama 3 menit, didinginkan, dan dikocok secara kuat. Hasil identifikasi akan menunjukkan positif senyawa saponin bila terbentuk buih yang stabil dan tidak hilang selama beberapa menit (Tiwari *et al.*, 2011).

**8.4 Identifikasi tanin.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun ranti masukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan metanol hingga ekstrak terendam dan tambahkan 2-3 tetes FeCl<sub>3</sub> 1%. Hasil identifikasi menunjukkan positif tanin bila terbentuk larutan berwarna coklat kehijauan, biru kehitaman, atau hijau kehitaman (Tiwari *et al.*, 2011).

## 9. Pembuatan larutan uji

**9.1 Glibenklamid.** Suspensi glibenklamid 0,09 mg/ml ini dibuat dengan melarutkan 5 mg glibenklamid yang telah ditimbang seksama ke dalam larutan CMC Na 0,5% hingga volume 100 ml.

**9.2 Larutan aloksan monohidrat.** Aloksan dalam penelitian ini digunakan untuk penginduksi diabetes. Larutan aloksan monohidrat dibuat dengan konsentrasi 1%. Cara pembuatan larutan aloksan dengan melarutkan 1 gram aloksan monohidrat pada larutan garam fisiologis dengan volume 100 ml.

**9.3 Larutan CMC Na 0,5%.** Larutan CMC Na 0,5% dibuat dengan melarutkan 0,5 gram CMC Na pada aquades yang panas  $\pm$  30 ml. Sebelum melarutkan CMC Na, aquadest panas didiamkan selama  $\pm$  15 menit sambil diaduk hingga membentuk larutan koloidal. Kemudian, tambahkan aquades sampai 100 ml (Togubu *et al.*, 2013).

## 10. Penentuan dosis

**10.1 Dosis aloksan monohidrat.** Penetapan dosis aloksan monohidrat menggunakan dosis 150 mg/kg BB. Aloksan monohidrat dilarutkan dengan garam fisiologis 0,9% dan diinjeksikan secara intraperitoneal pada hewan uji. Dosis aloksan yang diberikan pada tikus standar 200 g yaitu  $200 \text{ g}/1000 \text{ g} \times 150 \text{ mg}/\text{kg BB} = 30 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$

tikus. Volume pemberian maksimal pada tikus standar yang diinjeksi secara intraperitoneal sebesar 2,0-5,0 mL.

**10.2 Dosis sediaan uji.** Dosis sediaan uji yang akan diberikan pada tikus dalam penelitian ini berdasarkan Umamageswari *et al.* (2017) yang menunjukkan bahwa ekstrak air dari buah ranti dengan dosis 400 mg/kg BB tikus dapat menurunkan kadar glukosa darah pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan. Sehingga dosis yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB, dan 800 mg/kg BB. Dosis yang didapatkan ini akan diorientasi terlebih dahulu dengan cara jumlah volume pemberian ekstrak etanol daun ranti yang akan digunakan dihitung berdasarkan berat badan masing-masing tikus, lalu dilarutkan dengan CMC Na 0,5% dan diberikan secara oral pada tikus.

**10.3 Dosis glibenklamid.** Penetapan dosis glibenklamid berdasarkan dosis untuk manusia sebesar 5 mg/hari. Harus dilakukan konversi dosis dari manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram dengan nilai konversi 0,018. Dosis glibenklamid dikonversi  $5 \text{ mg} \times 0,018 = 0,09 \text{ mg}/200 \text{ gram BB tikus} = 0,45 \text{ mg/Kg BB tikus}$  (Togubu *et al.*, 2013).

## 11. Perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar yang memiliki berat badan 180-200 gram sebanyak 30 ekor dan dibagi dalam 6 kelompok. Tikus terlebih dahulu diadaptasikan selama 7 hari. Setelah 7 hari, tikus dipuasakan 16-18 jam untuk mengukur kadar glukosa awal (TO). Setiap tikus diberikan induksi aloksan 150 mg/kg BB secara intraperitoneal, kecuali pada kelompok kontrol normal tidak diberikan induksi aloksan. Setelah 3 dan 6 hari diperiksa kadar glukosa lagi (Ghate *et al.*, 2014). Tikus yang mengalami kenaikan kadar glukosa  $>200 \text{ mg/dL}$  dikelompokkan menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Kelompok hewan uji dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

Kelompok I : Kontrol normal (tikus diberi makan dan minum)

Kelompok II : Kontrol negatif (tikus diberikan suspensi CMC 0,5%)

Kelompok III : Kontrol positif (tikus diberikan glibenklamid)

Kelompok IV : Tikus diberikan ekstrak etanol daun ranti dosis 200 mg/kg BB tikus selama 10 hari.

Kelompok V : Tikus diberikan ekstrak etanol daun ranti dosis 400 mg/kg BB tikus selama 10 hari.

Kelompok VI : Tikus diberikan ekstrak etanol daun ranti dosis 800 mg/kg BB tikus selama 10 hari.

### **12. Pembuatan tikus diabetes**

Prosedur untuk membuat tikus diabetes dilakukan dengan menimbang semua tikus terlebih dahulu. Setelah itu, diberi tanda pengenalan pada masing-masing tikus. Dilakukan pengambilan darah pada hari pertama untuk mengukur kadar glukosa darah awal (T<sub>0</sub>). Setelah mengukur kadar glukosa awal dilakukan induksi aloksan pada tikus. Kemudian dilakukan pengambilan darah lagi untuk pengukuran kadar glukosa darah (T<sub>1</sub>) pada hari ke-3, tikus yang memiliki kadar glukosa darah >200 mg/dL dinyatakan mengalami diabetes melitus.

### **13. Penetapan kadar glukosa darah**

Pemeriksaan kadar glukosa darah dengan metode GOD-PAP dilakukan dengan cara pengambilan darah pada hewan uji melalui pembuluh darah vena orbitalis pada hari ke-7 dan ke-14. Kadar glukosa darah ditempatkan dengan metode GOD-PAP, darah yang sudah diperoleh ditampung pada tabung serologi. Kemudian untuk memisahkan serumnya darah disentrifugasi dengan kecepatan 400 rpm selama 15 menit. Setelah disentrifugasi serumnya diambil dan dimasukkan pada 3 tabung reaksi, yang terdiri dari tabung I standar (1000  $\mu$ L reagen + 10  $\mu$ L larutan standar), tabung II blangko (1000  $\mu$ L reagen + 10  $\mu$ L aquadest) dan tabung III sampel (1000  $\mu$ L reagen + 10  $\mu$ L serum). Untuk pengambilan reagen 1000  $\mu$ L digunakan mikropipet tip biru sedangkan untuk mengambil serum, larutan standar dan aquadest 10  $\mu$ L digunakan mikropipet tip putih. Kemudian dihomogenkan dan dilakukan inkubasi selama 10 menit pada temperature 20-25°C. Setelah inkubasi, kadar glukosa darah tikus diukur dengan spektrofotometer.

### **14. Prosedur mematikan dan membedah hewan uji**

Prosedur mematikan hewan uji secara fisik dilakukan dengan cara dislokasi leher. Cara dislokasi leher dilakukan dengan memegang ekor tikus kemudian letakkan pada permukaan yang telah diberi perlakuan agar tikus dapat meregangkan tubuhnya. Setelah itu, penyangga berbentuk pensil atau batang logam diletakkan di leher dan dipegang pada tangan kiri. Ekor tikus ditarik secara kuat menggunakan tangan kanan hingga leher tikus terkilir dan tikus mati (Stevani, 2016).

Hewan uji yang akan dibuat sebagai prepatat dalam penelitian ini sebanyak 1 hewan uji dari setiap kelompok perlakuan. Total hewan uji yang akan dikorbankan sebanyak 6 ekor tikus. Prosedur membedah

hewan uji tikus dengan cara menempatkan tikus pada pelat bedah menggunakan peniti. Proses membedah dimulai dari lambung atau rahim menggunakan gunting bengkok, setelah dibedah angkat organ pankreas. Organ yang diambil kemudian dibersihkan dari lemak yang masih menempel dan dicuci berulang kali menggunakan NaCl 0,9%. Setelah itu organ yang sudah dicuci letakkan pada wadah yang berisi formalin 4-10% dan buffer formalin.

### **15. Prosedur pembuatan preparat histopatologi**

Pertama, membuat preparat histopatologi dengan memfiksasi organ pankreas dalam larutan *buffer* formalin 10% selama 48 jam untuk menjaga komponen histologis dan menghindari terjadinya kerusakan jaringan.

Kedua, dehidrasi merupakan proses mengeluarkan air dari dalam jaringan. Cara dehidrasi yaitu dilakukan perendaman jaringan dengan etanol secara berturut-turut alkohol 70%, 80%, 95% I dan 95% II , alkohol absolut I, dan alkohol absolut II selama 1,5 jam.

Ketiga, *clearing* merupakan proses untuk menghilangkan alkohol pada jaringan. *Clearing* dilakukan karena alkohol dan parafin tidak dapat bercampur, sehingga larutan yang ditambahkan pada jaringan dapat berikatan dengan parafin. Pada proses *clearing* digunakan larutan xylol untuk menghilangkan alcohol (dealkoholisasi). Proses awal dilakukan dengan menempatkan jaringan ginjal dalam xylol I selama 30 menit, xylol II selama 1,5 jam, dan dilanjutkan xylol III selama 1,5 jam.

Keempat, infiltrasi parafin merupakan proses untuk membuat jaringan mengeras dan lebih mudah dipotong dengan mikrotom dengan memasukkan organ-organ tersebut ke dalam parafin hangat. Proses diawali dengan menempatkan jaringan secara berturut-turut pada parafin I, parafin II, dan parafin III selama 1 jam pada suhu 45°C dalam inkubator selama 1 malam.

Kelima, *embedding* atau penanaman jaringan pada paraffin dilakukan dengan cara jaringan diletakkan pada blok parafin. Diperoleh lapisan setebal 3-4 mikrometer pada pemotongan dengan mikrotom. Lapisan jaringan tersebut diletakkan pada kaca objek dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit.

Keenam, pewarnaan hematoksilin-eosin diawali dengan deparafinisasi menggunakan xylol untuk menghilangkan parafin pada jaringan dengan cara memasukkan jaringan ke dalam xylol I, II, III, dan IV selama 5 menit.

Ketujuh, rehidrasi merupakan proses mengembalikan cairan ke jaringan menggunakan larutan etanol. Rehidrasi dilakukan dengan cara memasukkan jaringan ke dalam alkohol absolut selama 5 menit, lalu masukkan tisu ke dalam alkohol 95% dan 70% secara bergantian selama 5 menit.

Kedelapan, *staining* atau tahap pewarnaan yaitu proses jaringan ditempatkan dalam larutan pewarna. Dilakukan perendaman jaringan pada pewarna hematoksilin selama 5-10 menit sambil diamati apakah jaringan berwarna ungu. Kemudian jaringan yang berwarna dicuci menggunakan air mengalir. Dilanjutkan pewarnaan dengan memasukkan sediaan ke dalam pewarna eosin selama 1-2 menit, dan dicuci menggunakan air mengalir.

Kesembilan, rehidrasi dilakukan untuk menarik air dari jaringan agar jaringan awet dan tidak cepat rusak. Rehidrasi dilakukan dengan merendam jaringan sebanyak 4 kali berturut-turut pada larutan etanol 70%, 80% dan 90% selama 30 detik. Kemudian jaringan direndam dalam etanol absolut dan dicelupkan sebanyak 4 kali berturut-turut selama 1 menit.

Kesepuluh, *clearing* atau penjernihan dilakukan dengan cara jaringan dimasukkan ke dalam larutan xylene I. Kemudian lakukan *mounting*, yaitu penutupan sediaan menggunakan gelatin sebagai perekat dan ditutup dengan *deck glass*.

## **16. Prosedur pemeriksaan histopatologi**

Prosedur pemeriksaan histopatologi jaringan pankreas tikus dilakukan setelah pemberian ekstrak etanol daun ranti. Pemeriksaan histopatologi jaringan pankreas dilakukan untuk membandingkan kelompok perlakuan dengan kelompok normal, kelompok negatif dan kelompok kontrol (pembanding). Pengamatan perubahan histopatologi dari setiap pankreas tikus dilakukan secara deskriptif pada suatu potongan jaringan (sediaan) dengan melihat adanya degenerasi dan nekrosis. Pada setiap sediaan dilakukan pengamatan pada dua atau lebih bidang pandang yang dipilih acak. Hasil pemeriksaan didokumentasikan dengan memotret menggunakan kamera digital. Kemudian dihitung jumlah perubahan yang telah ditemukan. Hasil yang diperoleh berupa data kualitatif yang kemudian diolah menjadi data kuantitatif dengan cara pemberian skor. Pengamatan histopatologi pankreas tikus ini dilakukan di laboratorium kampus Universitas Negeri Sebelas Maret, Surakarta.

## 17. Perhitungan kerusakan sel organ pankreas

Untuk menentukan dosis efektif bagi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, penilaian dilakukan untuk menghitung kerusakan yang ditimbulkan pada sel-sel organ pankreas. Dengan memeriksa jumlah pulau Langerhans di setiap bidang penglihatan, efek merugikan akibat masuknya zat diabetogenik dapat diamati. Untuk mengetahui presentase kerusakan organ pankreas diperoleh dari menghitung total inti sel dan total inti sel yang mengalami nekrosis yaitu piknosis, karioreksis, dan kariolisis. Dari hasil yang diperoleh akan menunjukkan apakah ada pengaruh perlakuan terhadap presentase kerusakan organ pankreas.

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

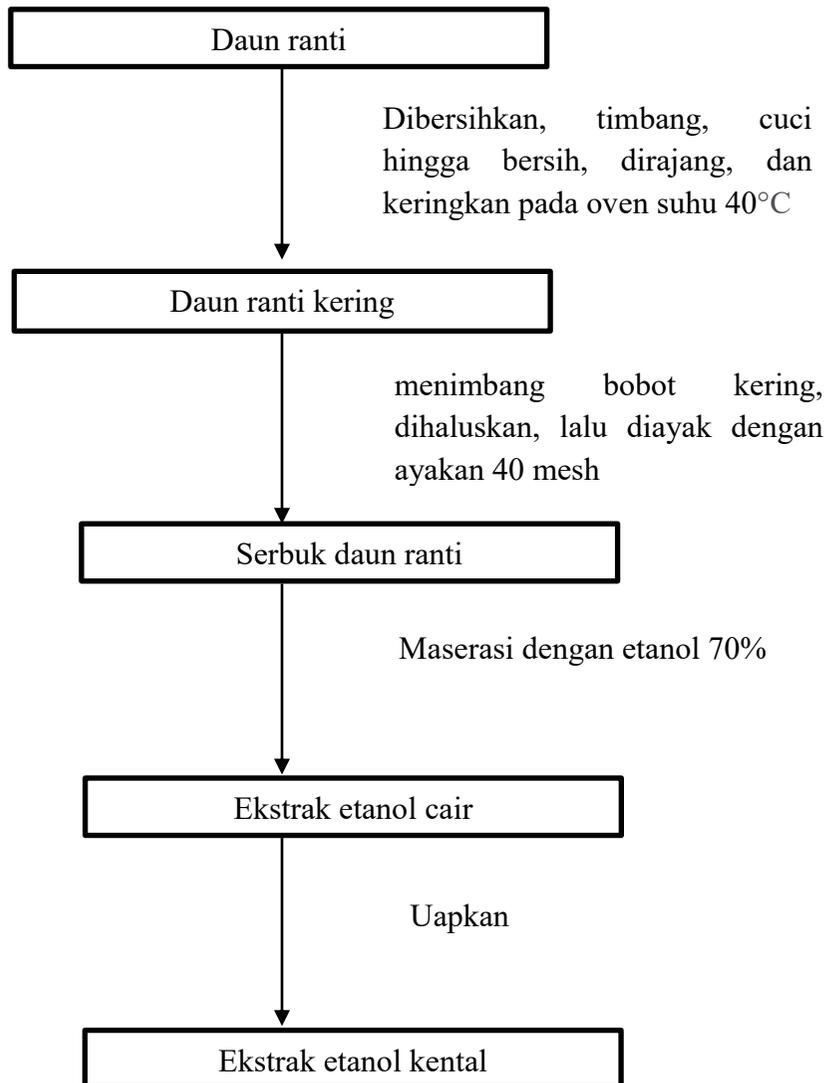
Untuk mengetahui tingkat kerusakan organ pankreas diperoleh dari mengamati dan menghitung total inti sel yang mengalami nekrosis yaitu piknosis, karioreksis, dan kariolisis. Hasil yang diperoleh berupa data kualitatif yang kemudian diolah menjadi data kuantitatif dengan cara pemberian skor. Skor 0: jika tidak ditemukan kerusakan (normal); skor 1: jika terdapat piknosis; skor 2: jika terdapat karioreksis dan skor 3: jika terdapat kariolisis. Semakin besar kerusakan yang terjadi pada pankreas maka semakin besar nilai skor kerusakan pankreas. Sedangkan, semakin kecil nilai skor kerusakan pankreas menunjukkan terjadinya perbaikan pada pankreas.

### E. Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini merupakan data yang dianalisis secara statistik untuk melihat dosis yang paling efektif sebagai antidiabetes dalam menurunkan kadar glukosa darah. Analisis statistik yang pertama dilakukan adalah melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk*. Data yang terdistribusi normal bernilai  $p > 0,05$  dan dilanjutkan uji *Homogeneity of Variance*. Jika data terbukti memiliki varian yang sama saat dilakukan uji *Homogeneity of Variance* maka dilanjutkan uji parametrik *one way ANOVA* untuk melihat apakah terdapat perbedaan yang signifikan atau tidak antara kelompok perlakuan. Setelah itu dilakukan *Post Hoc Test* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan diantara setiap kelompok perlakuan.

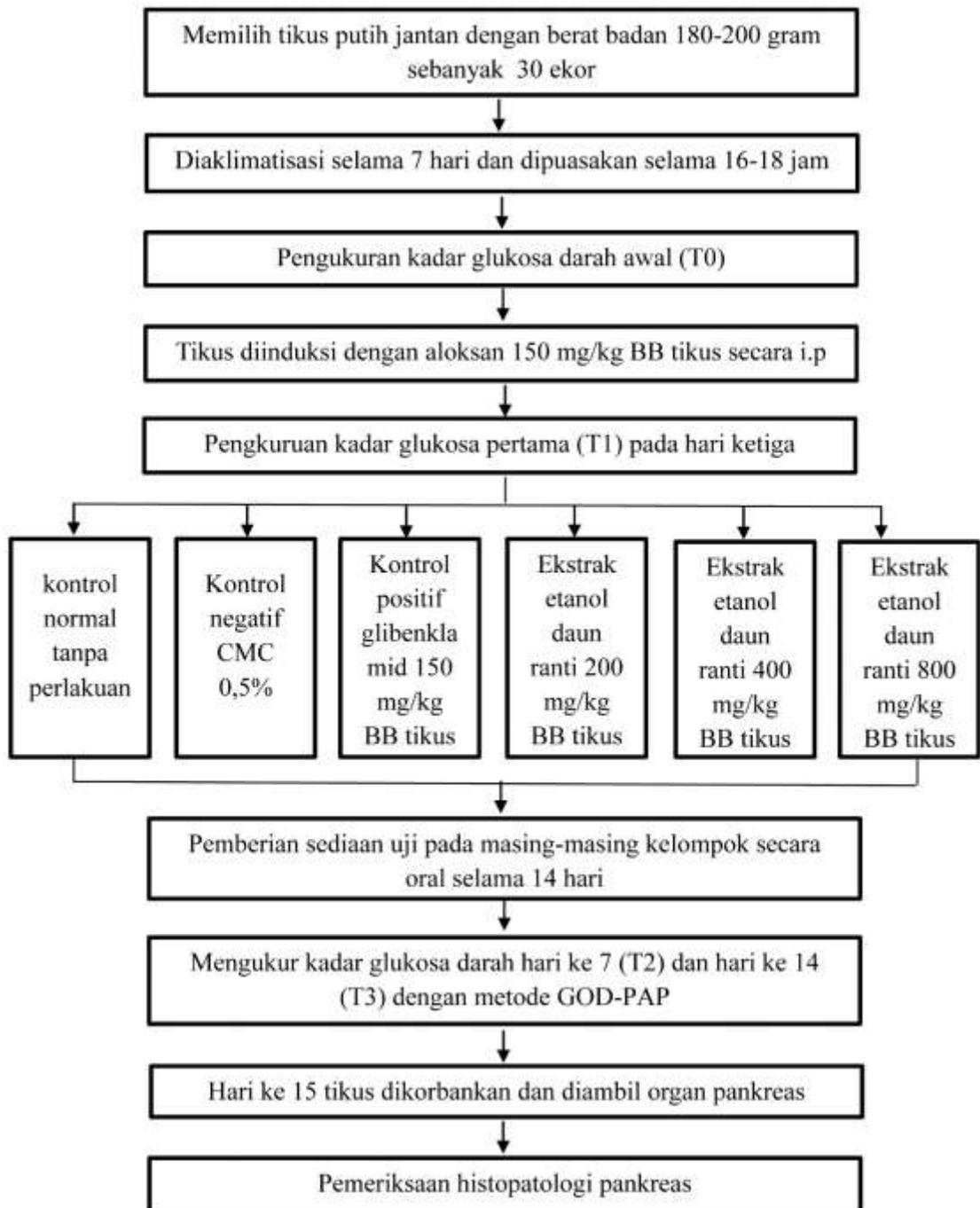
## F. Skema Penelitian

Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Ranti :



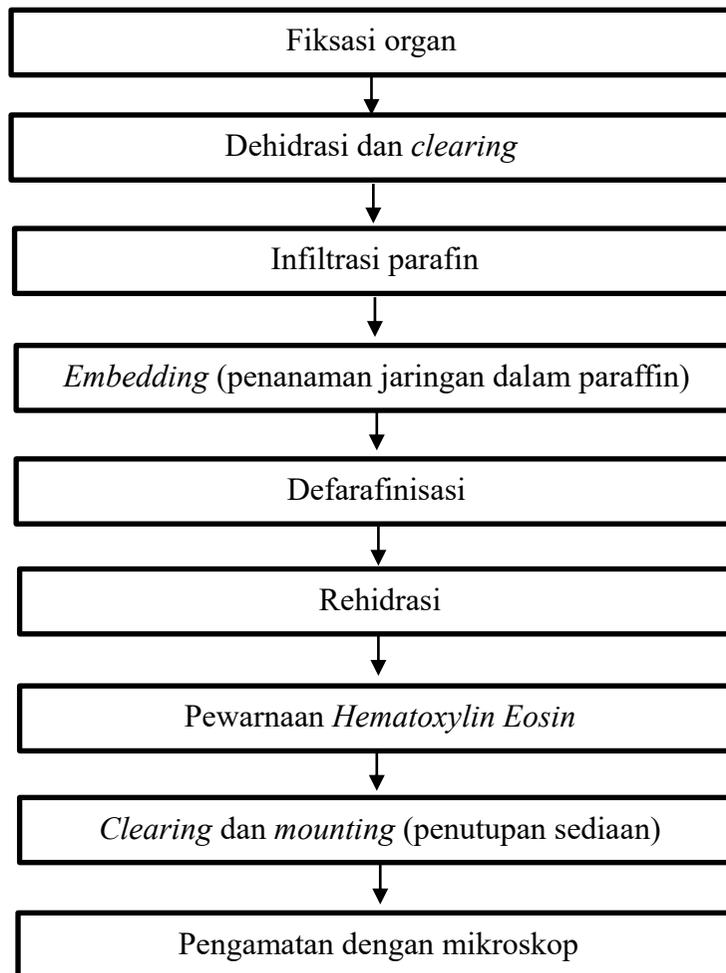
Gambar 6. Skema pembuatan ekstrak etanol daun ranti

## Skema Prosedur Pengujian :



Gambar 7. Skema uji aktivitas antidiabetes ekstrak etanol daun ranti

Skema Pemeriksaan Histopatologi :



**Gambar 8. Skema Pemeriksaan Histopatologi**