

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran dalam penelitian. Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah sediaan kapsul yang berisi granul ekstrak etanol daun batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) dengan bahan pengikat PVP.

Sampel adalah bagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan kapsul yang berisi granul ekstrak etanol daun batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) dengan variasi PVP konsentrasi 1%, 3%, dan 5%.

B. Variabel Penelitian

Variabel Independen merupakan variabel yang biasa disebut juga variabel prediktor dan stimulus. Variabel independent ini menjadi sebab timbulnya variabel dependen. Variabel independen dalam penelitian ini yaitu daun batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill.).

Variabel dependen merupakan variabel yang menjadi akibat. Dalam penelitian ini variabel dependennya adalah peningkatan produksi ASI.

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah granul ekstrak etanol daun batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) dengan variasi konsentrasi PVP 1%, 3%, dan 5% sebagai laktagogum pada induk tikus masa laktasi.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat dikelompokkan menjadi beberapa macam variabel antara lain: variabel bebas, variabel tergantung, variabel terkendali, dan variabel tidak terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung dengan perubahan yang dilakukan. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi konsentrasi PVP 1%, 3% dan 5% pada formula sediaan kapsul dengan ekstrak etanol daun batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill.).

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah uji

mutu fisik granul dan kapsul ekstrak etanol daun batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill), serta efek pemberian kapsul ekstrak etanol daun batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill) terhadap peningkatan berat badan anakan tikus dan jumlah dan diameter alveoli kelenjar *mammae* induk tikus.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara cepat dan tepat. Variabel terkendali yang dimaksud adalah bahan-bahan yang digunakan, alat-alat yang digunakan, media yang digunakan, proses pembuatan granul, penelitian, dan kondisi laboratorium.

Variabel tidak terkendali pada penelitian ini adalah kondisi di luar lingkungan yang tidak diharapkan seperti stress pada tikus.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun batang adas adalah daun batang yang diperoleh dari tanaman adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) yang didapatkan dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) adalah serbuk yang diperoleh dari pengeringan, penggilingan, dan pengayakan dengan ayakan nomor 60.

Ketiga, ekstrak etanol daun batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Keempat, hewan uji yang digunakan adalah tikus betina galur Wistar yang berumur 5-6 bulan dengan berat badan antara 200-300 gram yang telah siap bereproduksi.

Kelima, kapsul merupakan bentuk sediaan obat yang terbungkus oleh cangkang kapsul, cangkang kapsul yang membungkus obat dapat berupa cangkang kapsul lunak atau cangkang kapsul keras.

Keenam, uji aktivitas laktagogum adalah kemampuan dari kapsul ekstrak etanol daun batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) untuk meningkatkan produksi ASI dilihat dari peningkatan berat badan anak tikus, jumlah *alveoli* dan diameter kelenjar *mammae* induk tikus.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang dipakai dalam pembuatan simplisia kering, serbuk, ekstrak, dan skrining fitokimia ekstrak adalah sarung tangan, masker,

oven, timbangan digital, mesin grinding, ayakan nomor 60, timbangan analitik, moisture balance, sendok tanduk, botol coklat, corong kaca, corong plastik, kain flanel, kertas saring, *vacuum rotary evaporator* (Ika®), batang pengaduk, jar kaca, kaki tiga, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, waterbath, mortir, stamper, sudip, desikator, pipet volume, erlenmeyer, gelas ukur, beaker glass, cawan porselin.

Alat yang digunakan dalam pembuatan sediaan dan uji mutu fisik sediaan adalah timbangan, mortar dan stamper, alat *Moisture Balance*, oven, jangka sorong, seperangkat alat uji sudut diam dan waktu alir (*flow tester*), alat uji waktu hancur (*disintegration tester*), *stopwatch*, seperangkat alat uji pengetapan (*tap density tester*), oven, gelas ukur, *waterbath*, batang pengaduk, corong, beaker glass, ayakan nomor 16 dan 18, dan alat-alat laboratorium yang mendukung.

Alat yang dipakai untuk perlakuan hewan uji adalah sarung tangan, masker, tempat minum tikus, kandang tikus, jar kaca, timbangan tikus, sonde oral, spuit disposable.

Alat yang dipakai saat pembedahan, pengambilan organ, dan pengamatan organ adalah seperangkat alat bedah (jarum, gunting, scalpel, pinset, dan meja lilin), botol dehidrasi, inkubator, jar kaca, pipet tetes, beaker glass, kaset embedding, base mold, alat dehidrasi otomatis (Leica TP 1020), block imbedding (Leica 1105), alat potong beku (Leica), object glass, deck glass, alat pewarna jaringan, mikrotom putar (rotary microtome), dan mikroskop trinokuler (Leica®).

Alat yang dipakai untuk analisis data dan hasil adalah alat tulis dan laptop.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill.), tikus putih galur Wistar dengan jenis kelamin betina dan anakan, sekam, pakan, dan minum tikus.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah polivinil pirolidon (PVP), aerosil, laktosa, sukrosa, etanol 96%, etanol 80%, etanol, 90%, etanol absolut, CMC Na 0,5%, Lancar ASI® kaplet, Pewarna *Hematoxylin Eosin* (HE), aquadest, formalin 10%, pereaksi *Mayer*, pereaksi *Lieberman Burchard*, pereaksi *Dragendrof*, pereaksi *Wagner*, serbuk Mg, NaOH, FeCl₃, formaldehid, etanol, xylen, alkohol, anhidrida asam asetat, kloroform, asam sulfat, HCL 2N, serbuk magnesium, amil alkohol, xylene, asam klorida, besi (III) klorida, aquadest, spirtus, cangkang kapsul.

D. Jalannya Penelitian

1. Kelayakan Etik

Ethical clearance atau kelayakan etik merupakan keterangan tertulis yang diberikan oleh Komisi Etik Penelitian untuk riset yang melibatkan makhluk hidup yang menyatakan bahwa suatu proposal riset layak dilaksanakan setelah memenuhi persyaratan tertentu. Proposal penelitian diserahkan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi Surakarta.

2. Determinasi tanaman daun batang adas

Determinasi sampel daun batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) akan dilakukan di Balai Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Jawa Tengah untuk membuktikan kebenaran tanaman yang digunakan dibandingkan dengan ciri-ciri morfologi yang sesuai dengan kepustakaan.

3. Pengumpulan bahan

Sampel tanaman adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) yang digunakan diperoleh di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Bagian tanaman yang digunakan adalah batang dan daun adas yang dipanen dengan cara dipetik lalu dilakukan proses sortasi basah, dicuci dan dibersihkan dari pengotor yang menempel, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari dengan penutup kain hitam sampai didapatkan serbuk batang dan daun dengan kadar air tertentu, dilanjutkan dengan proses sortasi kering.

4. Pembuatan serbuk

Sampel yang telah kering kemudian digiling menggunakan mesin penggiling (*grinding*) lalu diayak dengan ayakan nomor 60 sampai didapatkan serbuk batang dan daun adas yang diinginkan. Serbuk yang diperoleh disimpan dalam wadah kering tertutup rapat.

5. Penetapan susut pengeringan serbuk daun batang adas

Penetapan susut pengeringan serbuk daun batang adas menggunakan alat *Moisture Balance*. Serbuk daun batang adas sebanyak 2 gram dimasukkan kedalam plat lempeng yang sebelumnya sudah ditara pada suhu 105°C.

Penetapan susut pengeringan dinyatakan selesai setelah bobot konstan dari alat *Moisture Balance*. Hasil pada monitor kemudian dicatat dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk mengetahui perubahan kadar air konstan pada sampel.

6. Penetapan kadar air serbuk daun batang adas

Pengujian kadar air dilakukan untuk mengetahui presentase kadar air di dalam serbuk. Penetapan kadar air dapat dilakukan dengan 2 metode. Metode yang pertama adalah metode gravimetri dan metode yang kedua adalah metode sterling bidwell/destilasi toluen. Kadar air pada penelitian ini ditetapkan dengan metode sterling bidwell/destilasi toluen. Toluene yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu, kemudian serbuk sebanyak 20 gram ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan ditambahkan toluen yang telah dijenuhkan. Labu dipanaskan selama 15 menit, setelah toluen mulai mendidih, penyulingan diatur 2 tetes/ detik, lalu 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, pemanasan dilanjutkan selama 5 menit. Biarkan tabung penerima dalam keadaan dingin mencapai hingga suhu kamar. Volume air dibaca sesudah toluen dan air memisah sempurna (Utami *et al.*, 2017).

7. Pembuatan ekstrak etanol daun batang adas

Pembuatan ekstrak etanol serbuk batang dan daun adas dilakukan dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% pada perbandingan 1:10. Serbuk batang dan daun adas ditimbang sebanyak 1 bagian lalu dimasukkan ke dalam bejana kemudian ditambahkan etanol 96%, direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk kemudian didiamkan selama 18 jam. Maserat dengan ampas dipisahkan dengan cara filtrasi menggunakan kain flanel. Proses penyarian diulang sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarutnya 1:5 dari volume pelarut pada penyarian pertama. Maserat kemudian dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 40 sampai diperoleh ekstrak kental (Kemenkes RI, 2013).

8. Penetapan susut pengeringan ekstrak etanol daun batang adas

Penetapan susut pengeringan ekstrak etanol daun batang adas menggunakan alat *Moisture Balance*. Ekstrak daun batang adas sebanyak 2 gram dimasukkan kedalam plat lempeng yang sebelumnya sudah ditara pada suhu 105°C.

Penetapan susut pengeringan dinyatakan selesai setelah mencapai bobot konstan dari alat *Moisture Balance*. Hasil pada monitor kemudian dicatat dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk mengetahui perubahan kadar air konstan pada sampel.

9. Penetapan kadar air ekstrak etanol daun batang adas

Pengujian kadar air dilakukan untuk mengetahui presentase kadar air di dalam ekstrak. Penetapan kadar air dapat dilakukan dengan 2 metode. Metode yang pertama adalah metode gravimetri dan metode yang kedua adalah metode sterling bidwell/destilasi toluen. Kadar air pada penelitian ini ditetapkan dengan metode gravimetri. Prosedur pertama yaitu menimbang ekstrak sejumlah 10 gram sampel kedalam kurs porselin yang sudah di tara kemudian dimasukkan kedalam oven selama 5 jam pada suhu 105°C. Pengeringan diulangi dengan oven selama 1 jam hingga diperoleh bobot konstan. Pemeriksaan kadar air ekstrak etanol daun batang adas dilakukan dengan replikasi sebanyak 3 kali. Catat perhitungan kadar dengan satuan persen. Persyaratan kadar air ekstrak etanol daun batang adas yang baik tidak melebihi dari 10% (Kemenkes RI, 2017).

10. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi senyawa kimia dilakukan untuk menetapkan kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak etanol daun batang adas. 500 mg ekstrak etanol daun batang adas menggunakan sedikit etanol 70% kemudian di tambahkan aquadest sampai 50 mL. Larutan yang sudah homogen kemudian disaring menggunakan kertas saring.

10.1 Identifikasi alkaloid. Larutan uji sebanyak 2 ml ditambahkan 5 ml asam klorida 2N kemudian dikocok. Filtrat dibagi menjadi tiga dalam masing-masing tabung reaksi kemudian diuji dengan pereaksi diantaranya 2 tetes reagen *Mayer*, *Bouchardat*, dan *Dragendroff*. Hasil *Mayer* positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih atau kuning, hasil *Dragendroff* positif ditunjukkan dengan terdapatnya endapan merah jingga, dan hasil *Bouchardat* positif ditunjukkan dengan adanya endapan coklat sampai hitam. Hasil dinyatakan positif mengandung alkaloid apabila sedikitnya 2 dari 3 pereaksi di atas memberikan hasil yang positif pada sampel (Handayani, 2019).

10.2 Identifikasi saponin. Larutan uji sebanyak 10 ml dalam tabung reaksi dikocok selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 detik. Pembentukan busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit. Positif saponin jika dilakukan penambahan 1 tetes HCL 2N busa tidak hilang (Depkes RI, 1995).

10.3 Identifikasi tanin. Larutan uji sebanyak 2 ml ditambahkan beberapa tetes pereaksi FeCl_3 0,1 % lalu diamati. Positif mengandung

senyawa tanin jika terjadi perubahan warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Harborne, 1987).

10.4 Identifikasi flavonoid. Larutan uji sebanyak 2 ml ditambahkan 0,1 g serbuk Mg, 1 ml HCl, dikocok dan dibiarkan memisah. Jika sampel positif mengandung flavonoid maka akan terjadi perubahan warna menjadi warna merah tua, merah muda, merah bata (Sulasmi *et al.*, 2018).

10.5 Identifikasi triterpenoid. Larutan uji sebanyak 2 mL dalam cawan porselin diuapkan menggunakan WB. Residu dilarutkan menggunakan 0,5 mL kloroform lalu dipindah dalam tabung reaksi. Larutan ditambah beberapa tetes pereaksi *Liebermann-Burchard* melalui dinding tabung. Positif triterpenoid ditandai dengan adanya cincin merah sampai ungu sedangkan bila positif steroid ditandai dengan muncul cincin hijau kebiruan (Ciulei, 1984; Susanti *et al.*, 2014).

11. Perhitungan dosis

11.1 Dosis lancar ASI. Obat lancar ASI sebanyak 1 kaplet dengan kandungan zat aktif daun katuk sebanyak 200 mg digerus kemudian disuspensikan dengan CMC Na 0,5% sampai volume 100 ml. Dosis lancar ASI sekali pakai untuk manusia dengan berat badan 70 kg yaitu 200 mg. Faktor konversi dari manusia dengan berat 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018 sehingga dosis lancar ASI untuk tikus 200 gram adalah $200 \text{ mg} \times 0,018 = 3,6 \text{ mg}/200 \text{ gram}$ berat badan tikus (18 mg / Kg BB tikus).

11.2 Penentuan dosis ekstrak etanol daun batang adas. Dosis ekstrak etanol daun batang adas yang memberikan aktivitas laktagogum sebesar 630 mg/Kg BB tikus (Indragiri, 2019).

Dosis absolute untuk tikus 200 gram = $630 \text{ mg}/1000 \text{ g} \times 200 \text{ g}$
 = 126 mg/200 g BB tikus

Volume pemberian maksimal untuk tikus secara per oral = 5 ml

Volume pemberian ideal untuk tikus secara per oral = 2,5 ml

Perhitungan untuk larutan stok 10 % adalah:

$$\text{Larutan stok } 10\% = \frac{10 \text{ g}}{100 \text{ ml}} = \frac{10.000 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Perhitungan untuk volume pemberian adalah:

$$\text{Volume pemberian} = \frac{126 \text{ mg}}{10.000 \text{ mg}} \times 100 \text{ ml} = 1,26 \text{ ml} / 200 \text{ g BB tikus}$$

12. Rancangan formula kapsul

Formula kapsul dirancang dengan variasi konsentrasi PVP yang berbeda pada setiap formula. Rancangan formula kapsul ekstrak etanol daun batang adas dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 2. Rancangan formula kapsul ekstrak etanol daun batang adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) (Najihuddin *et al.*, 2019)

Bahan	Komposisi (mg)			Fungsi
	F1	F2	F3	
Ekstrak daun batang adas	126	126	126	Zat aktif
Aerosil	63	63	63	Adsorben
Explotab	50	50	50	Penghancur
PVP	10	30	50	Pengikat
Mg stearat	10	10	10	Lubrikan
Laktosa	741	721	701	Pengisi

Granul dalam 1 formula dibuat dalam bobot 1 gram

Keterangan :

F1 :kapsul dengan ekstrak etanol daun batang adas dengan variasi konsentrasi PVP 1%

F2 :kapsul dengan ekstrak etanol daun batang adas dengan variasi konsentrasi PVP 3%

F3 :kapsul dengan ekstrak etanol daun batang adas dengan variasi konsentrasi PVP 5%

13. Pembuatan sediaan kapsul

Pembuatan sediaan kapsul terlebih dahulu diawali dengan pembuatan granul. Granul dibuat dengan metode granulasi basah. Granul dibuat dengan berbagai variasi konsentrasi PVP yaitu konsentrasi 1%, 3% dan 5%. Langkah pertama yang dilakukan adalah ekstrak kental dikeringkan menggunakan aerosil lalu tambahkan explotab dan laktosa, aduk sampai homogen. Masukkan bahan pengikat PVP, campur sampai homogen. Tambahkan etanol 96% aduk sampai terbentuk massa granul yang elastis. Campuran granul kemudian diayak dengan ayakan nomor 16, dan tebarkan diatas selembat kertas dalam nampan dangkal untuk kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40-50°C. Granul yang sudah kering kemudian diayak kembali dengan ayakan nomor 18. Granul yang telah melewati pengayakan kemudian tambahkan magnesium stearate 1% dengan lama waktu pencampuran selama ± 5 menit lalu lakukan uji mutu fisik granul. Masukkan granul ke dalam cangkang kapsul yang sesuai untuk dilakukan evaluasi kapsul.

14. Evaluasi Granul

14.1 Uji organoleptis. Uji organoleptis granul merupakan uji yang dilakukan untuk mengamati bau, warna, rasa, dan bentuk secara visual.

14.2 Uji kadar lembab. Uji dilakukan menggunakan alat *moisture balance*, sebanyak 2 gram dimasukkan kedalam plat lempeng yang sebelumnya sudah ditara pada suhu 105°C. Uji dinyatakan selesai setelah tercapai bobot konstan dari alat *moisture balance*. Hasil pada monitor kemudian dicatat dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk mengetahui perubahan kadar air konstan pada sampel. Syarat kandungan lembab yang baik adalah 2-5% (Lachman *et al.*, 2008).

14.3 Uji waktu alir. Uji dilakukan dengan menimbang 100 gram granul, dimasukkan ke dalam corong yang bagian bawahnya ditutup. Tutup corong dibuka, kemudian granul dibiarkan mengalir. Granul yang keluar dari alat tersebut dihitung kecepatan alirannya dengan menggunakan *stopwatch* dari mulai dibukanya tutup bagian bawah hingga semua massa granul mengalir keluar dari alat uji. Dicatat waktu yang dibutuhkan granul untuk mengalir seluruhnya. Laju alir yang baik adalah 4-10 g/detik (Lachman *et al.*, 2008).

14.4 Uji sudut diam. Granul kering yang dihasilkan sebanyak 100 g dimasukkan dalam corong di atas bidang horizontal membentuk tumpukan granul. Ukur tinggi kerucut dan diameter serbuk yang terbentuk dengan jangka sorong (Noval *et al.*, 2021). Sudut diam dengan kisaran 25-30° masuk dalam kategori sifat aliran yang baik, sedangkan untuk sudut diam kurang dari 25° diartikan memiliki kategori sifat alir sangat baik (Voigt, 1994). Sudut diam dapat dihitung dengan rumus dibawah ini :

$$\tan \alpha = \frac{h \text{ (tinggi kerucut)}}{r \text{ (jari-jari)}}$$

14.5 Uji indeks kompresibilitas/pengetapan. Granul kering dimasukkan ke dalam gelas ukur yang telah di letakkan di atas alat volumenometer untuk uji pengetapan. Granul diberikan getaran mekanik sebanyak 10 kali, 500 kali, dan 1250 kali ketukan hingga volume granul konstan. Jika perbedaan antara volume ketukan 500 kali (V_{500}) dan volume ketukan 1250 kali (V_{1250}) kurang dari atau sama dengan 2 mL maka V_{1250} adalah volume pemampatan (Kemenkes RI, 2020). Hasil dikatakan baik jika memiliki nilai indeks kurang dari 20% (Chandira *et al.*, 2012).

14.6 Uji BJ nyata, BJ mampat, dan Rasio Hausner (HR). Uji BJ nyata dan BJ mampat dilakukan dengan cara granul dimasukkan ke dalam gelas ukur 100 mL dan dicatat volume dan bobot granulnya, kemudian dilakukan pengetukan dengan alat hingga 500 ketukan untuk

mendapatkan volume mampatnya. Volume pada ketukan ke-10, ke-50, dan ke-500 diukur sesuai dengan skala yang terdapat pada gelas ukur (Kalalo *et al.*, 2019). Nilai rasio Hausner merupakan angka yang berhubungan dengan kemampuan sifat alir serbuk, dimana apabila semakin baik aliran maka semakin kecil pula nilai rasio Hausnernya. Rasio Hausner dihitung melalui perbandingan antara bobot jenis mampat (V2) dan bobot jenis nyata (V1) (Kumare *et al.*, 2013).

Perhitungan dilakukan sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{BJ nyata} &= \frac{\text{bobot granul}}{\text{volume awal}} \\ \text{BJ mampat} &= \frac{\text{bobot granul}}{\text{volume mampat}} \\ \text{Rasio Hausner} &= \frac{V_2}{V_1} \times 100\% \end{aligned}$$

15. Evaluasi Kapsul

15.1 Uji keseragaman bobot. Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) No. 32 Tahun 2019 menyatakan bahwa uji keseragaman bobot untuk untuk kapsul yang berisi obat tradisional kering adalah dari 20 kapsul, tidak lebih dari 2 kapsul yang masing-masing bobot isinya menyimpang dari bobot isi rata-rata lebih besar dari 10% dan tidak satu kapsulpun yang bobot isinya menyimpang dari bobot isi rata-rata lebih besar dari 25%.

15.2 Uji waktu hancur. Uji waktu hancur dilakukan dengan alat *disintegration tester*. Sebanyak 6 kapsul dimasukkan pada masing-masing tabung dari keranjang. Media yang digunakan adalah air dengan suhu $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Lakukan pengamatan terhadap kapsul, semua kapsul harus hancur kecuali bagian dari cangkang kapsul. Bila 1 atau 2 kapsul tidak hancur sempurna maka pengujian diulang dengan 12 kapsul lainnya, tidak kurang dari 16 dari 18 kapsul yang diuji harus hancur. Syarat untuk waktu hancur pada kapsul adalah ≤ 30 menit, untuk kapsul lunak ≤ 60 menit.

16. Penyiapan hewan uji

Penelitian ini menggunakan hewan uji sebanyak 24 ekor tikus putih betina galur Wistar dengan usia 2-3 bulan yang siap bereproduksi. Berat tikus yang dipakai adalah 200-300 gram yang dipelihara dalam kandang dengan suhu 21°C dan kelembaban 55%. Tikus diberi makan dan minum *ad libitum*. Hewan uji diaklimatisasi sebelum diberi perlakuan dengan membiasakan dalam kondisi percobaan dan mengontrol kesehatannya selama 1 Minggu. Tikus

dikelompokkan menjadi 4 kelompok. Setiap kelompok terdiri 6 ekor tikus dan akan mendapat perlakuan yang berbeda tiap kelompok, yaitu:
Kelompok I kelompok kontrol positif yang diberikan lancar ASI® kaplet

Kelompok II kelompok kontrol negatif yang diberikan kapsul tanpa ekstrak

Kelompok III kelompok yang diberikan formula dengan mutu fisik terbaik

Kelompok IV kelompok kontrol ekstrak 630 mg/kgBB.

17. Pengukuran parameter peningkatan berat badan anakan tikus

Pemberian sediaan untuk larutan uji dilakukan sebanyak sekali sehari pada secara oral menggunakan sonde kepada masing-masing induk tikus yang melahirkan hingga masa laktasi selama 14 hari. Data diambil dengan cara menimbang berat badan anak tikus pada hari pertama setelah induk melahirkan hingga hari ke 14. Penimbangan berat badan anak tikus dilakukan secara rutin sebelum dan sesudah anak menyusui. Penimbangan awal dilakukan pukul 09.00 (W1), penimbangan kedua dilakukan setelah anakan tikus dipisahkan dari induk selama 4 jam pada pukul 13.00 (W2), dan setelah digabungkan lagi bersama induknya pada pukul 14.00 (W3). selanjutnya dilakukan perhitungan rata-rata kenaikan berat badan anak harian menggunakan rumus $[(W3-W2) + (W2-W1)/4]$ (Ferdian dan Wijayahadi, 2018).

18. Penyiapan preparat histologi

Penyiapan preparate histologi dilakukan dengan cara hewan uji dikorbankan pada hari ke-15 dengan cara anestesi menggunakan metode penyuntikan dengan ketamine. Induksi ketamine dilakukan dengan dosis 50-75 mg/kgBB pada tikus. Penyuntikan ketamin dilakukan secara intramuscular. Ketamin dianggap paling aman, paling banyak digunakan, tidak menimbulkan depresi napas dan kardiovaskuler, juga memiliki efek analgesia (Vogel, 2008). Hewan uji kemudian dilakukan pembedahan dan di ambil kelenjar *mammae*. Jaringan kemudian difiksasi dengan tujuan untuk menjaga agar jaringan tetap normal dan tidak cepat rusak menggunakan formalin 10% selama 2 jam. Tahap selanjutnya yang dilakukan adalah tahap dehidrasi untuk mengeluarkan air yang terkandung dalam jaringan dengan menggunakan etanol berturut-turut etanol 70%, 80%, 95%, dan alkohol absolut I, II, III masing-masing selama 1,5 jam. Proses yang dilakukan selanjutnya adalah proses penjernihan (*clearing*). Proses penjernihan

dilakukan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan. Pengeluaran alkohol dengan parafin tidak dapat menyatu sehingga memerlukan tambahan larutan xylene agar alkohol dan parafin dapat berikatan. Tujuannya dilakukan proses ini adalah untuk menghilangkan alkohol (dealkoholisasi). Caranya dengan memasukkan jaringan ke dalam xylol I selama 1 jam, kemudian xylol II selama 1,5 jam selanjutnya xylol III selama 1,5 jam. Proses selanjutnya yaitu tahap *blocking*, tahap *blocking* merupakan proses pembuatan blok preparat agar organ dapat dipotong dengan mikrotom kemudian dilanjutkan dengan tahap *embedding* atau penanaman jaringan dalam parafin dengan cara memasukan jaringan ke dalam blok parafin. Pemotongan dengan mikrotom menghasilkan lapisan dengan ketebalan 3-4 mikrometer, lapisan jaringan diletakkan di atas kaca objek diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit.

Tahap selanjutnya masuk ke dalam tahap pewarnaan menggunakan pewarnaan *hematoxylin-eosin* (HE). Tahap ini diawali dengan deparafinisasi dengan xylol yang bertujuan untuk menghilangkan parafin pada jaringan. Caranya dengan memasukkan jaringan ke xylol I, II, III, IV masing-masing selama 5 menit. Tahap pewarnaan yang telah selesai kemudian dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan tujuan untuk mengembalikan cairan ke dalam jaringan dengan menggunakan larutan etanol. Langkah pertama dengan memasukkan jaringan ke dalam alkohol absolut selama 5 menit, selanjutnya jaringan dimasukkan ke dalam alkohol 95%, 70% secara bergantian masing-masing selama 5 menit. Setelah selesai, selanjutnya dilakukan dengan tahap *staining*. Tahap *staining* merupakan proses jaringan dimasukkan ke dalam larutan pewarna. Jaringan dimasukkan ke dalam pewarna *hematoxylin* selama 5-10 menit, kemudian diamati apakah jaringannya sudah berwarna ungu. Jaringan yang sudah diwarnai tadi dicuci di bawah air mengalir. Setelah itu, pewarnaan dilanjutkan dengan memasukkan sediaan ke dalam pewarna eosin selama 1-2 menit dicuci di bawah air mengalir. Tahap selanjutnya yang dilakukan adalah tahap rehidrasi tujuannya untuk menarik air dari jaringan agar awet dan tidak cepat rusak. Jaringan dicelupkan 4 kali secara berurutan ke dalam larutan etanol 70%, 80% dan 90% masing-masing selama 30 detik. Selanjutnya direndam dengan etanol absolut dicelupkan sebanyak 4 kali, masing-masing selama 1 menit. Setelah semua proses berakhir, tahap terakhir yang dilakukan yakni proses penjernihan (*clearing*), caranya adalah dengan memasukan jaringan ke

dalam larutan xylen I dan dilakukan *mounting* yaitu penutupan sediaan dengan menggunakan gelatin sebagai perekat dan ditutup dengan *deck glass*.

19. Pemeriksaan histologi

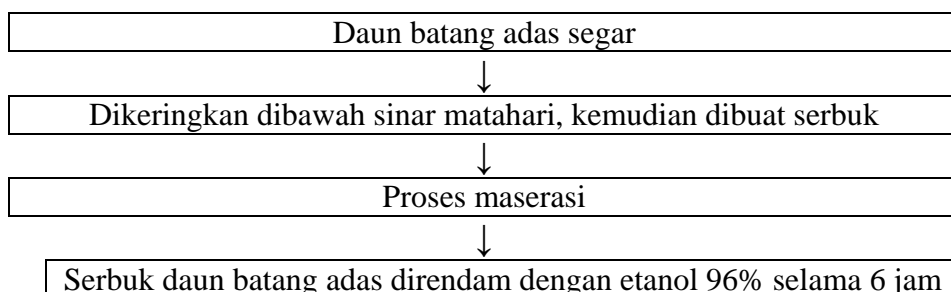
Pembacaan sampel dilakukan dengan menghitung jumlah dan mengukur diameter alveoli induk tikus menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400x. Perhitungan jumlah alveoli dilakukan sebanyak 3 lapang pandang dan diameter alveoli diamati sebanyak 3 buah alveoli dalam 1 lapang pandang mikroskop (Kharisma *et al.*, 2011).

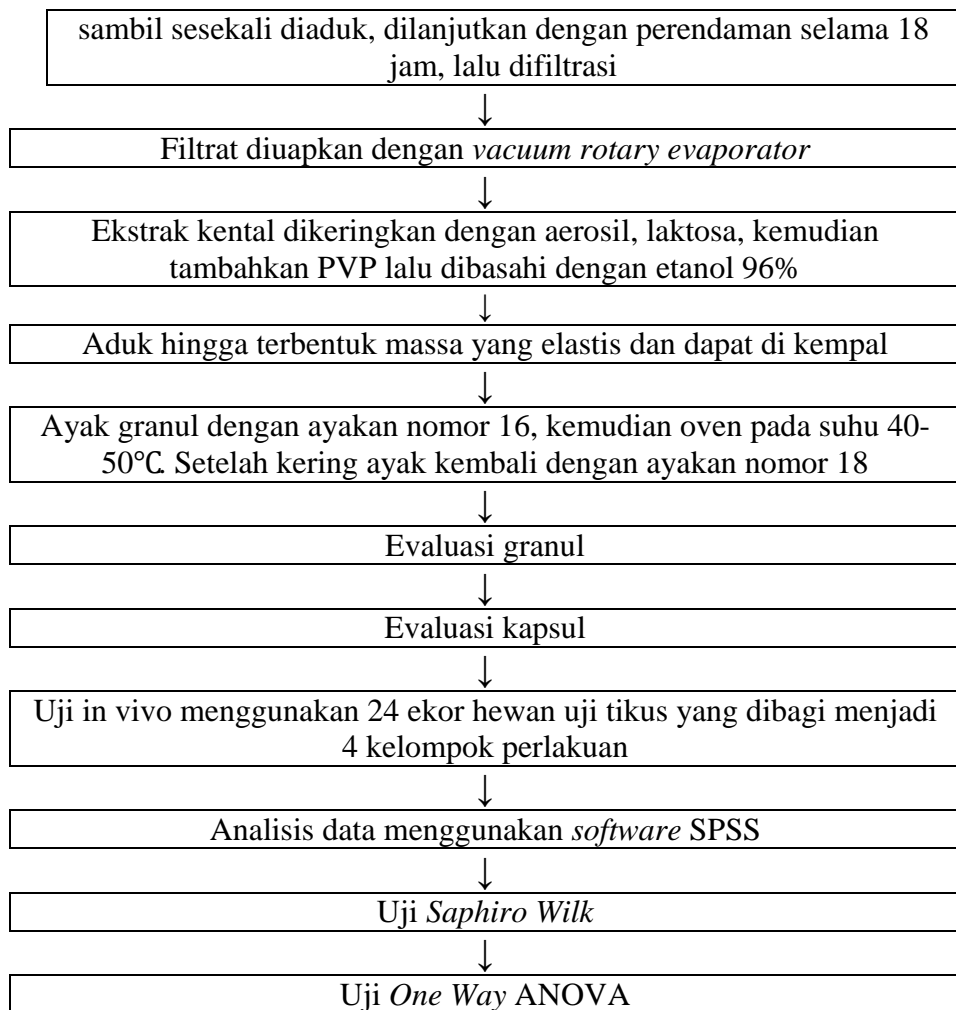
E. Analisis Hasil

Data yang didapatkan pada saat penelitian yaitu data peningkatan berat badan anak tikus dan gambaran histologi kelenjar *mammae* induk tikus kemudian dianalisa menggunakan *software SPSS for Windows Release 21.0* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan.

Pengolahan data dilakukan dengan tujuan untuk melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji distribusi normal *Shapiro wilk*. Data yang memenuhi persyaratan ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan analisis parametrik menggunakan *Analysis of Varian (ANOVA) one way* dengan taraf kepercayaan 95% dengan *LSD test* untuk melihat apakah terdapat perbedaan diantara masing-masing kelompok perlakuan. Data yang jika dalam pengujian tidak memenuhi persyaratan ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan analisis non-parametrik dengan uji *Kruskall-Wallis* atau *Mann Whitney*.

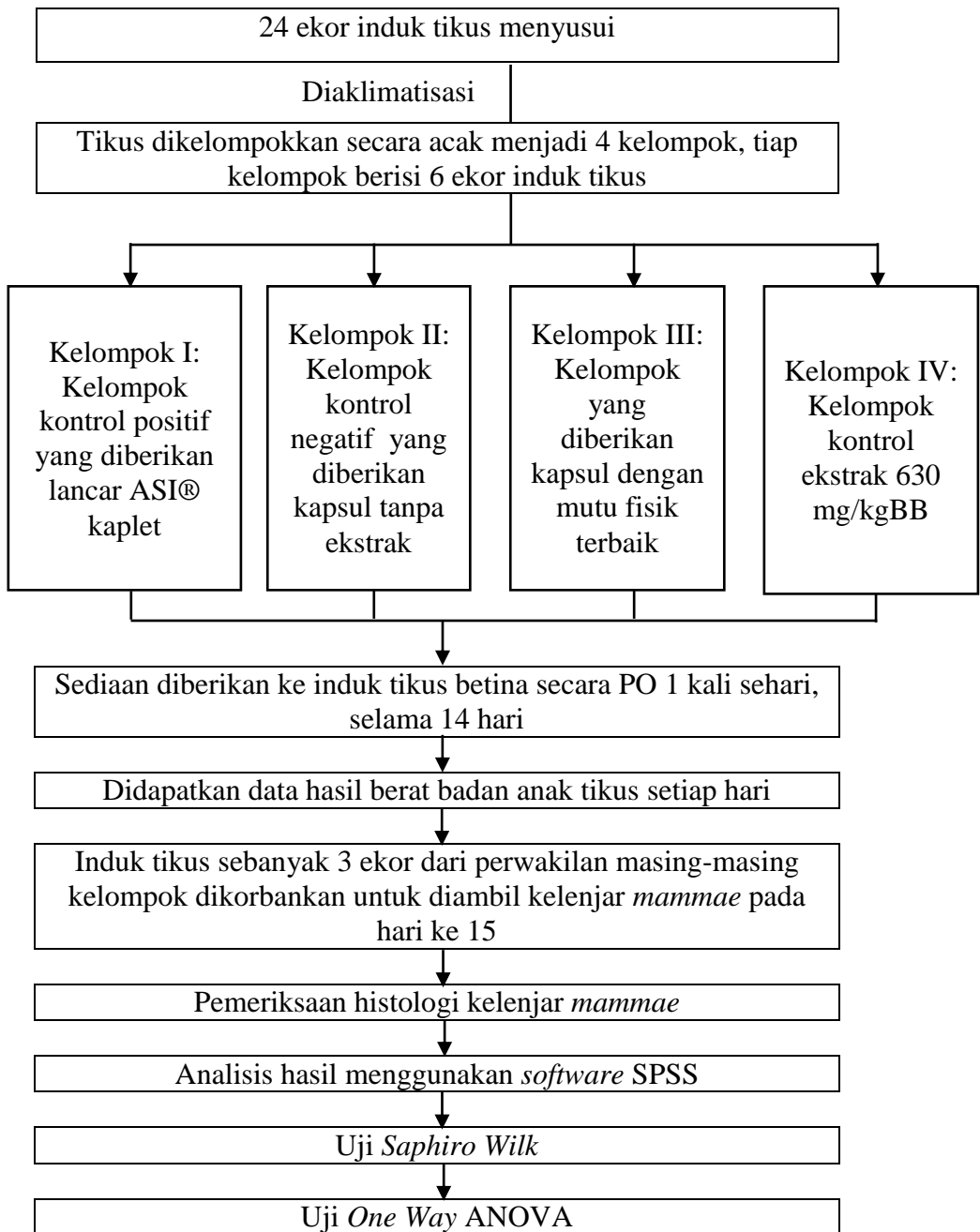
F. Skema Penelitian





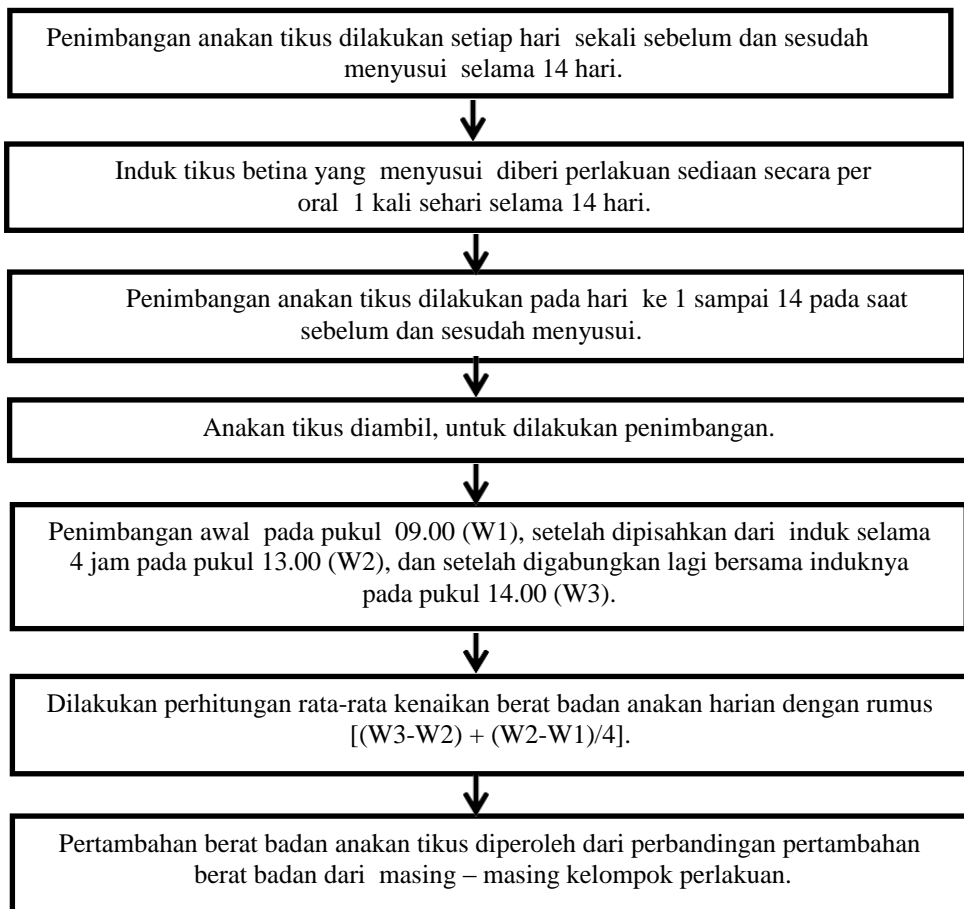
Gambar 4. Skema alur penelitian.

G. Skema Uji Aktivitas Hewan Uji



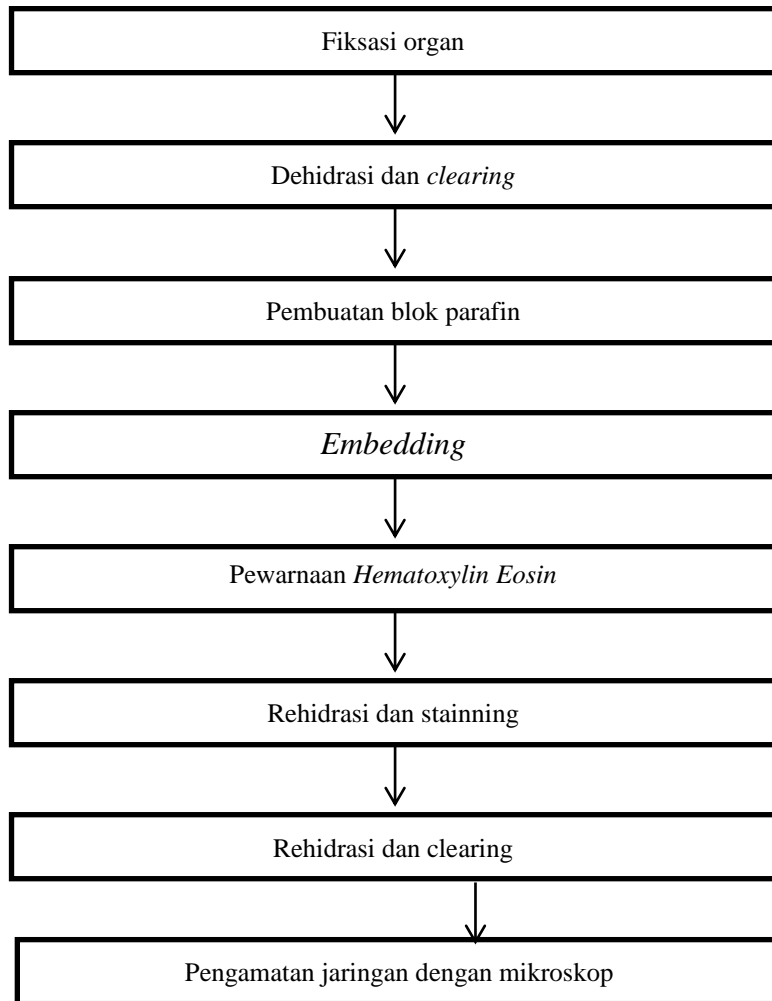
Gambar 5. Skema uji aktivitas hewan uji.

H. Prosedur Penimbangan Berat Badan Anak Tikus



Gambar 6. Skema prosedur penimbangan berat badan anak tikus.

I. Alur Pemeriksaan Histologi



Gambar 7. Skema alur pemeriksaan histologi kelenjar mammae induk tikus.