

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Determinasi tanaman dan karakterisasi dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Pengukuran kadar glukosa darah, mikroalbuminuria, dan serum kreatinin dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gadjah Mada. Histopatologi ginjal dilakukan di Laboratorium Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Maret 2024 sampai Mei 2024. Determinasi tanaman dilaksanakan pada bulan Maret 2024. Pengerangan simplisia dilakukan pada bulan Maret 2024. Pembuatan ekstrak dilakukan pada bulan Maret 2024. Perlakuan hewan uji dilakukan pada bulan April 2024 – Mei 2024 Pengumpulan dan analisis data dilakukan pada bulan April 2024 – Mei 2024.

B. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) yang diperoleh dari waduk cengklik Ngargorejo, Kec. Ngemplak, Kabupaten Boyolali, Jawa Tengah. Sampel mewakili populasi yang dijadikan sumber segala informasi yang diperlukan untuk menyelesaikan masalah penelitian. Oleh karena itu, sampel adalah bagian dari populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) dipilih dengan kualitas paling baik, segar, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, tidak ditumbuhi oleh jamur.

C. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Identifikasi variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah aktivitas antidiabetes ekstrak etanol daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes*). Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antidiabetes nefropati ekstrak etanol daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) pada kadar microalbumin dan serum kreatinin. Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah

aktivitas antidiabetes nefropati ekstrak etanol daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) pengaruh terhadap histopatologi ginjal.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama dikelompokkan menjadi beberapa variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol. Variabel bebas adalah bagian dari variabel utama yang diubah untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud adalah dosis ekstrak daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) 61,25 mg/kg BB tikus, 122,5 mg/kg BB tikus dan 245 mg/kg BB tikus yang memiliki aktivitas pada diabetes nefropati.

Variabel tergantung yaitu kadar glukosa darah, mikroalbuminuria, serum kreatinin, dan histopatologi ginjal tikus yang diinduksi STZ-NA, dengan nilai variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas.

Variabel terkontrol dari penelitian ini adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung dalam penelitian ini adalah tikus, pemeliharaan tikus, dan pemberian dosis STZ-NA.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) merupakan daun eceng gondok segar berwarna hijau yang diperoleh dari waduk cengkilik Ngargorejo, Kec. Ngemplak, Kabupaten Boyolali, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun eceng gondok merupakan tanaman yang sudah dikeringkan dengan oven pada suhu 40° C kemudian diblender menjadi serbuk halus dan diayak dengan pengayak no mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) adalah hasil ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% selama 5 hari kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

Keempat, hewan uji adalah tikus putih jantan galur wistar yang diperoleh dari Laboratorium Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

Kelima, penginduksian diabetes nefropati adalah penginduksian tikus secara intraperitoneal dengan menginjeksi STZ 45 mg/Kg dan Nikotinamid 110 mg/Kg BB

Keenam, pengukuran kadar glukosa darah adalah parameter diabetes mellitus dengan mengambil sampel darah tikus efek

menggunakan metode GOD-PAP yang dinyatakan dalam (mg/dL) dengan pencampuran beberapa reagen pereaksi.

Ketujuh, pengukuran kadar albumin dan kreatinin pada hari ke-0 (T0), ke-3 (T1), ke-24 (T2), ke-31 (T3) dan hari ke-38 (T4) adalah parameter diabetes nefropati dengan mengambil sampel urin dan darah untuk melihat dari rasio albumin dan kreatinin menggunakan metode *Immunoturbidimetric test* dan metode *jaffe* dengan pencampuran beberapa reagen pereaksi dan pengukuran menggunakan spektrofotometer.

Kedelapan, dosis efektif adalah dosis terkecil yang memberikan efek sebanding dengan kontrol positif.

Kesembilan, histopatologi ginjal adalah pengambilan sampel preparat ginjal tikus untuk melihat pengaruh fungsi organ ginjal dari hewan uji yang diinduksi STZ-NA dan pengaruh setelah pemberian ekstrak daun eceng gondok dengan melakukan pengamatan jaringan dibawah mikroskop.

D. Alat dan Bahan

1. Bahan

Penelitian ini menggunakan daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) sebagai bahan utama, bahan-bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96%, ammonia, anisaldehyd asam sulfat, asam asetat, asam klorida (HCl), asam sulfat, aquadest, besi (III) klorida (FeCl_3), *citrate-buffer saline*, etil asetat, kloroform, methanol, n-butanol, n-heksan, Natrium Karboksil Metil Selulosa (Na CMC), Nikotinamida (NA), reagen Mayer, pereaksi *Dragendroff*, kit *Glucose* GOD FS, kit Urea FS, kit *Creatinine* FS, *streptozotocin* (STZ), xylen.

2. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini bejana stainless steel, penangas air (waterbath), vacuum *rotary evaporator*, alat-alat gelas, timbangan tikus, timbangan analitik, krus porselen, oven, lumpang dan stamper, spuit injeksi 1.0mL, 3.0 mL, spuit oral, pisau, sonifikator, sentrifuge, kuvet disposibel semimikro 1.5 mL, mikropipet 5-50 μ L dan 100-1000 μ L, Sterling-Bidwell, *spektrofotometer visible* (Star Dust FC15).

E. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) diperoleh dari Waduk Cengklik, Ngargorejo, Kec. Ngemplak, Kabupaten Boyolali, Jawa Tengah.

2. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan untuk memastikan tumbuhan yang diperiksa pada penelitian ini telah sesuai dengan tumbuhan yang dimaksud, sehingga menghindari kesalahan dalam pemilihan bahan tumbuhan. Determinasi dilakukan untuk mengetahui klasifikasi dan jenis kedudukan tumbuhan. Determinasi tanaman dilakukan di Universitas Setia Budi Surakarta.

3. Pengajuan *Ethical Clearance*

Pada penelitian ini dilakukan pengujian pada Komisi Etik Penelitian RSUD Dr. Moewardi Jl. Kolonel Sutarto No.132, Jebres, Kec. Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah 57126. *Ethical Clearance* merupakan syarat dalam melakukan penelitian yang melibatkan makhluk hidup yang menyatakan bahwa suatu proposal penelitian layak dilaksanakan setelah memenuhi persyaratan tertentu.

4. Proses Pembuatan Simplisia

Pada umumnya pembuatan simplisia melalui tahapan sebagai berikut: pengumpulan simplisia, sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan dan sortasi kering

4.1 Pengumpulan Simplisia. Pengumpulan simplisia. bagian yang diambil adalah daun eceng gondok yang segar dan diambil langsung.

4.2 Sortasi Basah. Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan kotoran dan zat asing lainnya seperti tanah, kerikil, rumput, batang, daun, akar yang rusak dan kontaminan lainnya.

4.3 Pencucian. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada simplisia. Pembilasan dengan air jernih. Pembilasan tidak bisa begitu saja menghilangkan semua bakteri karena air cucian yang digunakan seringkali mengandung beberapa bakteri, dalam arti air yang digunakan untuk mencuci menentukan jenis awal dan jumlah bakteri

4.4 Perajangan. Perajangan dilakukan untuk membantu proses pengeringan. Pencacahan dapat dilakukan dengan pisau, alat mesin khusus untuk mencabik-cabik untuk mendapatkan irisan tipis atau

potongan dengan ukuran yang diinginkan. Semakin halus bahan yang akan dikeringkan, semakin cepat air menguap, meningkatkan waktu pengeringan.

4.5 Pengeringan. Pengeringan simplisia dilakukan dengan hati-hati agar daunnya tidak mudah rusak dan bisa awet dalam waktu yang lama. Simplisia dikeringkan dibawah sinar matahari atau menggunakan suatu alat pengering. Hal-hal yang perlu diperhatikan selama pengeringan adalah suhu pengeringan, kelembaban udara, aliran udara dan waktu pengeringan.

4.6 Sortasi Kering. Sortasi kering merupakan langkah terakhir dalam proses pembuatan simplisia. Tujuannya untuk memisahkan pengotor seperti bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering. Proses ini dilakukan sebelum simplisia dikemas untuk penyimpanan selanjutnya. Demikian juga, partikel pasir, besi, dan benda-benda tanah lain yang tertinggal harus dibuang sebelum simplisia dibungkus.

4.7 Penyiapan Serbuk Simplisia. Serbuk simplisia terbuat dari daun yang dicincang halus yang telah dikeringkan. Setelah didapatkan simplisia kering, dilanjutkan dengan pemurnian. Penghalusan dilakukan dengan cara diblender hingga diperoleh serbuk daun eceng gondok

5. Karakterisasi Simplisia

5.1 Susut Pengeringan. *Moisture balance* merupakan alat untuk penentuan karakterisasi simplisia. Tujuannya mengetahui hasil dari simplisia daun eceng gondok, apakah memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan. Sebanyak 2 g serbuk diletakkan pada nampan alat *moisture balance* ditutup alat kemudian diatur suhu (105°C) dan waktu selanjutnya nilai susut pengeringan akan muncul pada alat dalam satuan %.

5.2 Kadar air. Serbuk daun eceng gondok ditimbang sebanyak 20 g, dimasukkan dalam labu destilasi dan diberi pelarut xylen sampai serbuk terendam, kemudian alat *Sterling-Bidwell* dipasang. *Sterling-Bidwell* menetapkan kadar air berdasarkan volume yang tertera di skala alat tersebut dan selanjutnya dihitung kadar airnya dalam satuan persen dengan rumus:

$$\text{Kadar Air: } \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

5.3 Kadar Abu Total. Sebanyak 2 g serbuk eceng gondok yang telah dihaluskan dimasukkan kedalam krus silikat yang telah dipijar

dan ditara, selanjutnya dipijarkan perlahan-lahan hingga terbentuk abu, lalu didinginkan dan ditimbang. Kadar abu dinyatakan dalam % b/b (Kemenkes RI, 2017).

$$\text{Kadar abu total: } \frac{\text{Berat abu pijar-krus kosong}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

5.4 Kadar Abu Tidak Larut Asam. Abu yang didapat dari penetapan kadar abu total ditambahkan 25 mL asam klorida encer LP selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dalam asam disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas dan dipijarkan dalam krus hingga bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b.

Kadar abu tidak larut asam:

$$\frac{\text{Berat abu sisa pijar tidak larut asam - krus kosong}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

6. Perencanaan Dosis

6.1 Dosis Ekstrak Daun Eceng Gondok. Pada penelitian sebelumnya Priyoherianto *et al.*, (2020) dosis efektif ekstrak daun eceng gondok adalah 17,5mg/kg BB mencit diduga mampu menurunkan kadar glukosa darah. selanjutnya dilakukan faktor konversi dari mencit ke tikus adalah 7. Didapatkan dosis tikus sebesar 24,5 mg/200g BB tikus. Diketahui volume maksimal pemberian secara PO adalah 5 mL, rekomendasi pemberian secara PO adalah 2,5 mL. Orientasi dosis ekstrak daun eceng gondok dilakukan untuk mengetahui dosis optimal, dengan dosis efektif (DE) sebesar 12,25, 24,5 dan 49 mg/200g BB tikus diberikan secara peroral. Untuk pembuatan larutan stok DE 12,25 mg/200g BB tikus dengan menimbang 0,49 g ekstrak daun eceng gondok ad 100 ml suspensi CMC NA 0,5%, Untuk pembuatan larutan stok DE 24,5 mg/200 g BB tikus dengan menimbang 0,98 g ekstrak daun eceng gondok ad 100 ml suspensi CMC NA 0,5% dan Untuk pembuatan larutan stok DE 49 mg/200 g BB tikus dengan menimbang 1,98 g ekstrak daun eceng gondok ad 100 ml suspensi CMC NA 0,5%.

6.2 Dosis Pioglitazone. Volume maksimal larutan uji secara oral yang dapat diberikan pada tikus dengan berat badan 150 – 200 g adalah 2,5 mL. Dosis pioglitazone yang digunakan untuk manusia adalah 30 mg/kg BB manusia. Faktor konversi dari manusia dengan berat badan 70 kg pada tikus dengan berat badan 200 g adalah 0,018. Sehingga dosis yang diberikan ke tikus adalah 0,27 mg/200 g BB tikus.

6.3 Pembuatan Suspensi NaCMC 0,5%. Menimbang sebanyak 0,5 g Na-CMC dimasukkan ke dalam mortir yang berisi 30 mL aquadest hangat, lalu didiamkan selama 15 menit hingga didapatkan massa yang transparan, digerus sampai homogen, selanjutnya diencerkan dengan air suling dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, dicukupkan volumenya hingga tanda batas.

6.4 Pembuatan Larutan Induksi *Streptozotocin* (STZ) – *Nicotinamide* (NA). *Streptozotocin* (STZ) ditimbang lalu dilarutkan dengan citrate buffer saline dengan pH 4,5. Dosis STZ yaitu 45 mg/kg BB, dan diinduksi pada tikus secara intraperitoneal dengan interval waktu 3 hari. Dosis NA yang digunakan yaitu 110 mg/kg BB, NA diberikan untuk melindungi sel pankreas. Pemberian NA secara i.p 15 menit sebelum pemberian STZ (Ghasemi *et al.*, 2014; Szkudelski, 2012).

7. Pembuatan Ekstrak

Ekstrak dibuat dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Satu bagian serbuk kering dimasukkan kedalam maserator, ditambah dengan 10 bagian etanol 70%, lalu dilakukan perendaman selama 3 hari sambil sekali-kali digojog, kemudian didiamkan. Maserat kemudian dipisahkan dan lakukan pengulangan proses sebanyak 2 kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Semua maserat dikumpulkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Randemen yang diperoleh ditimbang dan dicatat.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

8. Karakterisasi Ekstrak

Dilakukan dengan mengamati bentuk organoleptic ekstrak menggunakan panca indera dengan mendiskripsikan bentuk, warna, bau dan rasa.

8.1 Kadar Air. Serbuk daun eceng gondok ditimbang sebanyak 10 g, dimasukkan dalam labu destilasi dan diberi pelarut *xylene* sampai serbuk terendam, kemudian alat *Sterling-Bidwell* dipasang. *Sterling-Bidwell* menetapkan kadar air berdasarkan volume yang tertera di skala alat tersebut dan selanjutnya dihitung kadar airnya dalam satuan persen dengan rumus:

$$\text{Kadar air: } \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

8.2 Kadar Abu Total. Sebanyak 2 g ekstrak daun eceng gondok yang dimasukkan kedalam krus silikat yang telah dipijar dan ditara, selanjutnya dipijarkan perlahan-lahan hingga terbentuk abu, lalu didinginkan dan ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b.

$$\text{Kadar abu total: } \frac{\text{Berat abu sisa pijar} - \text{Krus kosong}}{\text{Berat ekstrak}} \times 100\%$$

8.3 Kadar Abu Tidak Larut Asam. Penambahan 25 mL asamklorida encer LP selama 5 menit kedalam abu hasil penetapan kadar abu total, dikumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, dan disaring melalui kertas saring bebas abu, selanjutnya dicuci dengan air panas dan dipijarkan dalam krus hingga bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b. Kadar abu tidak larut asam:

$$\frac{\text{Berat abu tidak larut asam} - \text{Krus kosong}}{\text{Berat ekstrak}} \times 100\%$$

9. Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia

9.1 Flavonoid. Identifikasi ini dilakukan dengan menimbang sebanyak 2 mg ditambahkan air panas sebanyak 10 mL kemudian dipanaskan selama 5 menit. Identifikasi dilakukan dengan cara filtrat 5 mL ditambahkan sedikit serbuk logam Mg 1 mL Hcl pekat dan 1 mL amil alkohol kemudian di kocok apabila terjadi warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid.

9.2 Saponin. Identifikasi ini dilakukan dengan menimbang 0,5 gr ditimbang dan dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambah 5 ml aquadest kemudian dikocok dengan kuat. Uji saponin menunjukkan hasil positif jika terbentuk busa setinggi kurang lebih 1 cm dan tetap stabil setelah didiamkan selama 15 menit.

9.3 Tanin. Identifikasi ini dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,1gr ditambahkan 5 mL aquadest kemudiaan didihkan selama 5 menit. Larutan ini disaring dan filtratnya ditambahkan dengan 5 tetes FeCl 1 %. Uji tannin menunjukkan hasil positif jika terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan

9.4 Steroid/Triterpenoid Identifikasi ini dilakukan dengan 0,1 g ekstrak yang akan diperiksa dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 – 3 tetes asam asetat anhidrat, lalu diaduk secara perlahan beberapa saat sampai kering, kemudian ditambahkan 1 – 2 tetes asam sulfat pekat dan diamati pewarnaan yang timbul.

Pewarnaan merah atau merah ungu memberikan indikasi triterpenoid sementara pewarnaan hijau - biru untuk steroid.

10. Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Percobaan

Pada penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus berumur 2 – 3 bulan dengan berat badan 150 – 200 g yang kemudian diaklimasi selama 7 hari. Pengelompokan tikus dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri dari kelompok I (kontrol negatif), kelompok II (kontrol positif), kelompok III – V (kontrol perlakuan). Pada kelompok I diberikan induksi STZ – NA dan CMC – Na, kelompok II diberikan STZ – NA dan pioglitazone, kelompok III – V diberikan induksi STZ – NA dan ekstrak daun eceng gondok.

Pada awal perlakuan dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah, mikroalbuminuria dan serum kreatinin (T0) selanjutnya penelitian kelompok kontrol (negatif, positif dan perlakuan) diinduksi NA 110 mg/kg BB dan STZ 45 mg/kg BB, lalu dipantau kadar glukosa darah, mikroalbuminuria dan serum kreatinin pada hari ke-3 (T1) setelah induksi. Selanjutnya, pada hari ke-24 (T2) menimbang berat badan dan kembali diukur kadar glukosa darah, mikroalbuminuria dan serum kreatinin. Pada hari ke-25 diberikan ekstrak daun eceng gondok pada kelompok III, IV dan V. Pemberian ekstrak daun eceng gondok dan pioglitazon diberikan selama 14 hari, selanjutnya dipantau kadar glukosa darah, mikroalbuminuria, dan serum kreatininnya pada hari ke-31 (T3) dan hari ke-38 (T4). Pada hari ke-39 hewan dikorbankan dan diambil preparat sampel ginjal dari hewan percobaan untuk pemeriksaan histopatologi ginjal.

Tabel 2. Kelompok Berdasarkan Perlakuan

Kelompok	Perlakuan
I	Kontrol negatif (Suspensi CMC-Na 0,5%)
II	Kontrol positif (Pioglitazone 30mg)
III	Ekstrak daun eceng gondok 61,25 mg/kg BB tikus
IV	Ekstrak daun eceng gondok 122,5 mg/kg BB tikus
V	Ekstrak daun eceng gondok 245 mg/kg BB tikus

11. Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Darah diambil melalui sinus orbital mata tikus dengan menggunakan pipa mikrohematokrit. Tetesan darah ditampung di *eppendorf*, selanjutnya disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Lapisan serum yang terpisah diambil dan dipipet sebanyak 10 μ L kemudian ditambahkan pereaksi atau reagen sebanyak 1000 μ L, dicampurkan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C, selanjutnya didapatkan hasil absorbansinya.

Pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan dengan menggunakan metode GOD-PAP (*enzymatic photometric test*) dengan prinsip kerja enzim glucose oksidase atau heksosinase yang bereaksi pada glukosa. Enzim glukooksidase (GOD) membantu glukosa untuk dioksidasi membentuk asam glukonat dan hidrogen peroksida. *Hydroxyperoxide-4-aminoantipyrine*, yang mengandung indikator fenolik, dikatalisis oleh POD (*dioxyperoxide*) untuk membentuk air (kompleks berwarna) dengan quinoneamine. Identifikasi warna merah yang terbentuk sebanding dengan kadar glukosa yang terbentuk dalam sampel. (Subiyono *et al.*, 2016).

$$\text{Glukosa (mg/dL)} = \frac{\Delta \text{ Sampel}}{\Delta \text{ Standar}} \times \text{Konsentrasi standar (mg/dL)}$$

12. Pemeriksaan Mikroalbuminuria

Pemeriksaan mikroalbuminuria dilakukan dengan menyiapkan sampel urin tikus. Pemeriksaan mikroalbuminuria menggunakan metode imunoturbidimetri, dengan prinsip kerja penentuan konsentrasi albumin dalam urin melalui fotometrik dengan reaksi antigen-antibodi terhadap albumin yang ada didalam sampel. Tikus diberi air hangat sebanyak 8 mL secara per oral, kemudian dimasukkan ke dalam kandang metabolik. Sampel urin ditampung dan diambil sebanyak 20 μL , selanjutnya menambahkan 350 μL reagen 1 (TRIS pH 7,5 + NaCl) dan 70 μL reagen 2 (TRIS pH 8,0 + NaCl) lalu dibaca absorbansi melalui spektrofotometer (415 nm). Kemudian hitung rasio albuminnya. Nilai acuan rasio albuminuria urin adalah normal (<30 mg/L) dan dinyatakan sebagai mikroalbuminuria (≥ 30 mg/L)

13. Pemeriksaan Kreatinin

Menggunakan metode *Jaffe* untuk memeriksa kadar kreatinin. Kadar kreatinin normalnya adalah 1,2 mg/dL. Kadar kreatinin diukur menggunakan spektrofotometer. Untuk menentukan kadar kreatinin, terlebih dahulu dibuat monoreagen dengan mencampurkan empat bagian reagen 1 (Natrium hidroksida) dengan satu bagian reagen 2 (Asam pikrat), dan 10 μL serum uji direaksikan dengan 1000 μL tes. pereaksi (reagen kreatinin) kemudian dihomogenisasi menggunakan vorteks. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer (490 nm) pada 37°C selama 60 detik (A1) Panjang gelombang tersebut merupakan titik di mana pigmen hasil dari reaksi antara kreatinin dan asam pikrat memiliki absorbansi maksimum, kemudian serapan diukur kembali setelah 120 detik (A2). Selisih antara A2-A1 digunakan untuk

menghitung kadar kreatinin untuk blanko (reagen dan air suling) dan standar (standar reaktan dan kreatinin).

$$\text{Kreatinin (mg/dL)} = \frac{\Delta \text{ Sampel}}{\Delta \text{ Standar}} \times \text{konsentrasi standar (mg/dL)}$$

14. Histopatologi Ginjal

Hewan percobaan dianestesi terlebih dahulu menggunakan eter sebelum dikorbankan untuk diambil organ ginjal dan kemudian dibuat preparat histopatologi ginjal dan dilakukan pengujian.

14.1 Fiksasi Jaringan. Jaringan akan mengalami autolysis ketika terlepas dari tubuh. Fiksasi dibuat untuk dapat mengamati jaringan dengan struktur yang mendekati struktur ketika masih hidup. Formalin di dalam phosphate buffer saline (PBS) pH 7,4 adalah fiksasi kimia yang paling sering digunakan untuk memfiksasi jaringan agar integritas sel dalam jaringan tetap dapat dipertahankan.

14.2 Embedding. *embedding* bertujuan untuk memperkeras jaringan agar dapat dipotong tipis. Prosedur dalam melakukan embedding ada beberapa tahap, yaitu dehidrasi, penjernihan, dan pembuatan blok paraffin.

14.3 Pemotongan Jaringan. Pemotongan jaringan/pengirisan dilakukan untuk memperoleh jaringan dengan ketebalan tertentu (3-8 mikron) dengan mikrotom sangat diperlukan agar jaringan mudah diamati di bawah mikroskop.

14.4 Pewarnaan Jaringan. Pewarnaan jaringan dilakukan dengan pewarnaan *hematoxiline* dan *eosine*.

14.5 Mounting. *Mounting* dilakukan dengan merekatkan antara penutup (deck glass) dengan object glass pada irisan jaringan yang telah diwarnai, biasanya menggunakan kanda balsam.

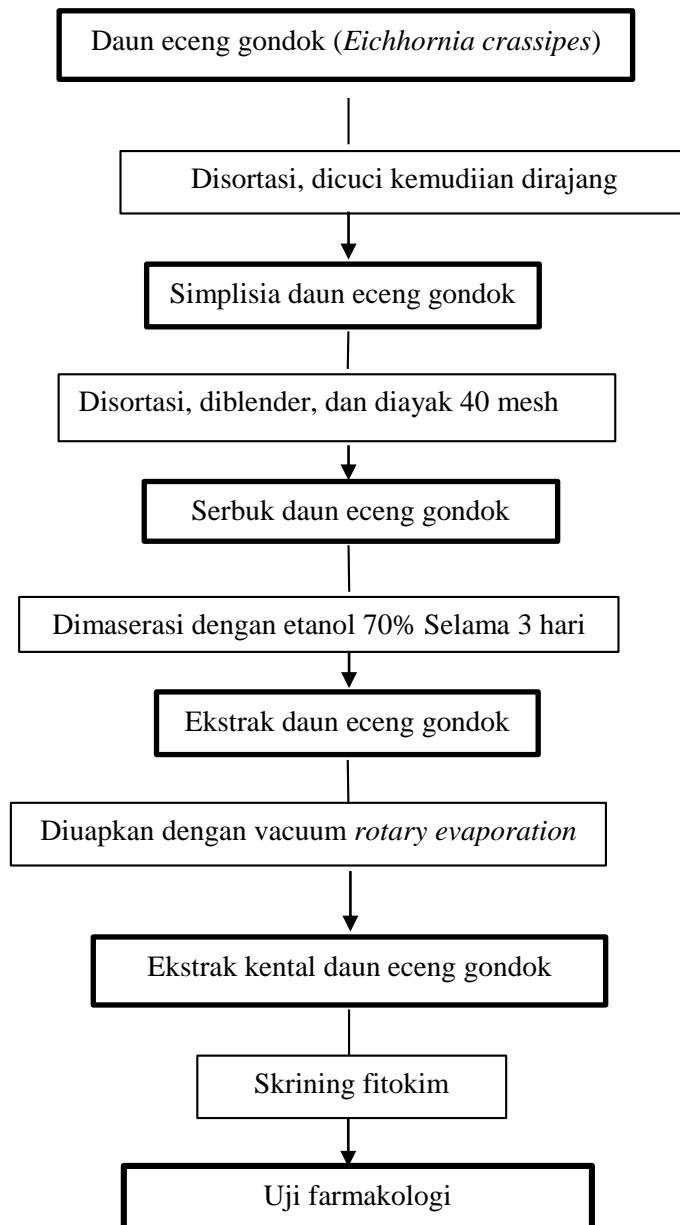
14.6 Pengamatan Jaringan dengan Mikroskop. Untuk mengamati gambaran nyata jaringan maka dilakukan pengambilan gambar secara mikrofotografi (perbesaran 1000x) dan kamera mikroskop (Optilab) untuk menganalisa hal seperti hitung jumlah, skala dan pengukuran jarak serta keterangan pada gambar sehingga diperoleh hasil yang jelas dan dapat dipertanggung jawabkan.

F. Analisa Data

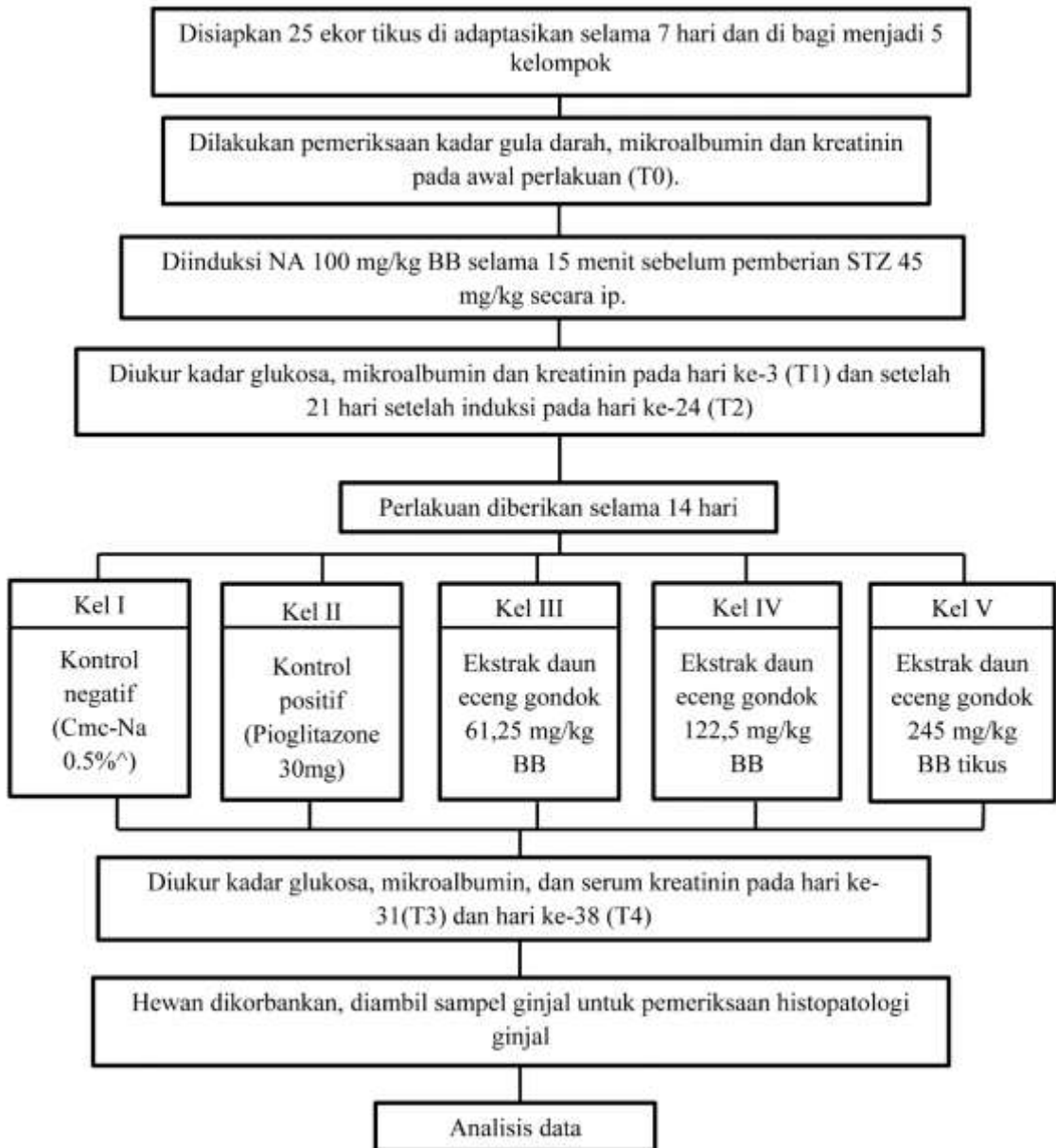
Data yang diperoleh berupa kadar glukosa darah, kadar mikroalbuminuria, dan serum kreatinin kemudian dilakukan uji statistik. Analisis pertama uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan *Levene Statistic*. Apabila data yang diperoleh $p > 0,05$ artinya sampel tersebut terdistribusi normal dan homogen, sebaliknya apabila diperoleh $p < 0,05$ artinya sampel tersebut tidak terdistribusi normal dan tidak homogen dilanjutkan dengan metode non-parametrik *Kruskal-Wallis Test* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan pada semua kelompok dan dilanjutkan dengan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata antara 2 kelompok dari semua kelompok, jika terjadi perbedaan bermakna.

Uji selanjutnya bila data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan ke uji parametrik *One Way ANOVA* jika terdapat perbedaan bermakna dilakukan uji *Post Hoc* yaitu *Tukey* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antar masing-masing jika kelompok perlakuan. Nilai – nilai yang dianggap signifikansi secara statistik ketika signifikansi nilainya kurang dari 0,05 ($p < 0,05$).

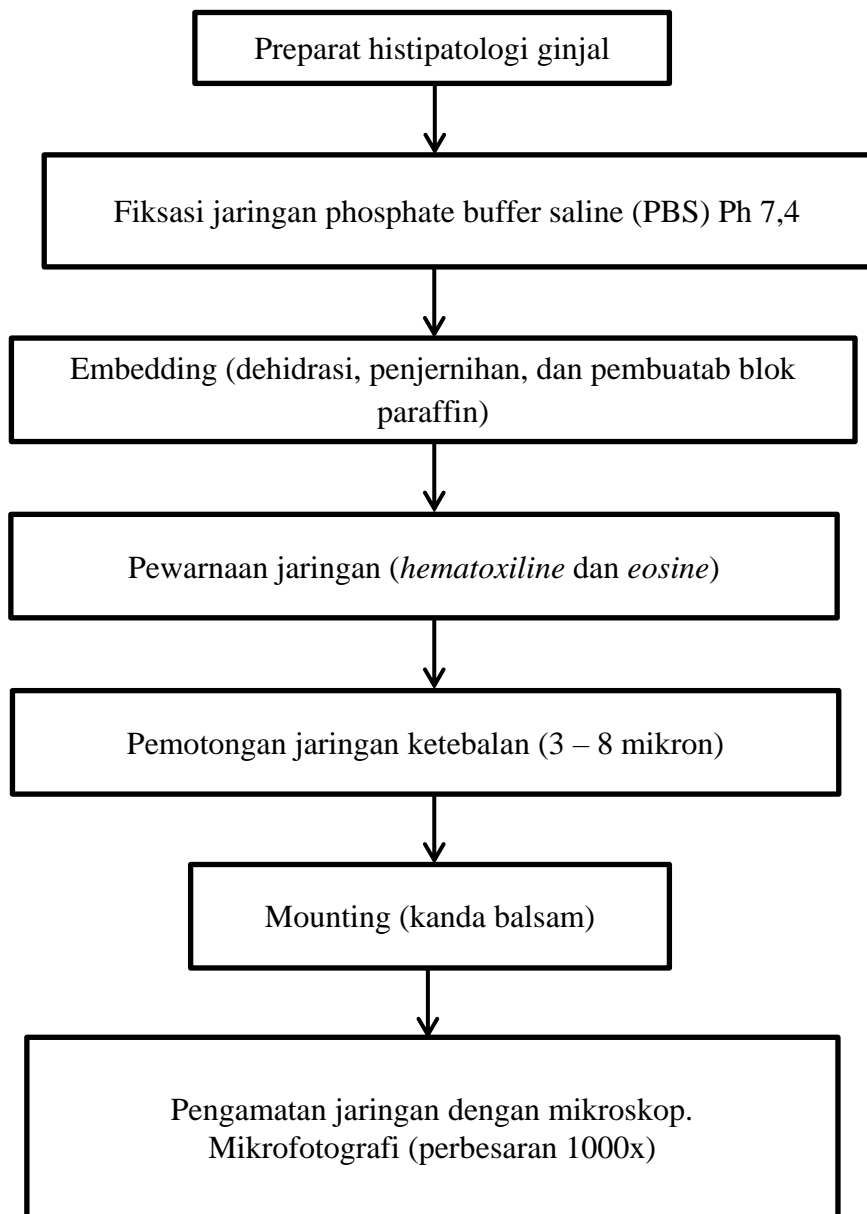
G. Rancangan Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian Pembuatan Ekstrak Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*)



Gambar 6. Alur Penelitian Uji Farmakologi



Gambar 7. Alur Prosedur Histopatologi