

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

##### **1. Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang diperoleh dari daerah Mojosongo, Surakarta, Jawa Tengah.

##### **2. Sampel**

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam yang diambil secara acak dari daerah Mojosongo, Surakarta, Jawa Tengah pada bulan Januari 2014, dengan kondisi daun segar warna hijau.

#### **B. Variabel Penelitian**

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

Variabel utama pertama yang digunakan adalah serbuk daun salam yang dibuat menjadi ekstrak dengan metode *soxhletasi* menggunakan penyari etanol 70%.

Variabel utama kedua, efek diuretik yang dilihat dari parameter volume urin dan parameter analisis kimia urin tikus yang terdiri dari analisis glukosa, protein, urea, dan kreatinin.

Variabel utama ketiga adalah tikus jantan (*Rattus norvegicus*) yang berumur 2-3 bulan dengan berat  $\pm 200$  gram.

## **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang diidentifikasi terdahulu dapat diklasifikasikan kedalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian adalah variabel yang diinginkan untuk diteliti terhadap variabel tergantung. Dalam hal ini variabel bebasnya adalah efek diuretika ekstrak etanolik daun salam.

Variabel tergantung merupakan titik pusat persoalan yang menjadi kriteria dalam penelitian ini. Variabel tergantung dari penelitian ini adalah aktivitas efek diuretika ekstrak etanolik daun salam dilihat dari volume urin, kandungan glukosa, protein, urea, dan kreatinin pada tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*).

Variabel terkendali adalah yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, lingkungan tempat hidup, jenis kelamin, galur, kondisi percobaan, laboratorium dan kondisi pengukur atau peneliti.

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

Batasan-batasan operasional variabel yang sesuai dengan permasalahan dalam penelitian ini adalah:

Daun salam adalah daun dari tanaman salam yang diambil dari daerah Mojosongo, Surakarta, Jawa Tengah dengan ciri berbentuk lonjong sampai elip atau bundar telur sungsang pangkal lancip sedangkan ujung lancip sampai tumpul, permukaan licin, pertulangan menyirip.

Serbuk daun salam adalah serbuk dari tanaman salam yang dibuat dengan cara daun dibersihkan dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C kemudian diblender sampai menjadi serbuk halus dan diayak dengan ayakan no. 60.

Ekstrak daun salam adalah serbuk dari tanaman salam yang diproses dengan alat soxhlet dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1,5 kali sirkulasi dan dipanaskan dengan api melalui labu alas bawah, ekstrak yang dihasilkan diambil dan dipekatkan dengan penangas air.

Hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvergicus*), yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan yang seragam dan setiap kelompoknya terdiri dari atas lima kelompok perlakuan.

Analisis kimia urin tikus putih galur wistar (*Rattus norvergicus*) terhadap parameter kimia urin meliputi analisis glukosa, protein, urea, dan kreatinin. Metode yang digunakan untuk menganalisis urin tikus putih adalah dengan menggunakan carik celup untuk mengetahui parameter glukosa dan protein dengan alat mission U120. Urea dan kreatinin dengan menggunakan alat fotometer stardust FC.

## **C. Bahan dan Alat**

### **1. Bahan**

Bahan sampel yang digunakan adalah daun salam, yang diambil dari tanaman salam, secara acak yang mempunyai ciri-ciri ciri berbentuk lonjong

sampai elip atau bundar telur sungsang pangkal lancip sedangkan ujung lancip sampai tumpul permukaan licin, pertulangan menyirip.

Bahan kimia yang digunakan sebagai penunjang adalah aquadest, etanol 70%, CMC, aquadest yang diperoleh di Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, obat furosemid sebagai kontrol positif yang diperoleh dari apotek.

## **2. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan simplisia sampai menjadi ekstrak yaitu oven, blender, timbangan analitis, ayakan no.60. Seperangkat alat soxhletasi. Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji adalah kandang tikus, timbangan analitik, *stopwatch*, gelas ukur, *handskoon*, kertas saring, jarum oral (sonde). Alat yang digunakan untuk menganalisis urin tikus adalah carik celup, wadah carik celup sebagai standar warna, beaker glass, mission U120 untuk urinalisis, fotometer stardust FC.

## **3. Binatang percobaan**

Binatang yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvergicus*) yang berumur 2-3 bulan dengan berat berkisar 150-200 g, yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi tanaman**

Tahap pertama dalam penelitian adalah dengan melakukan determinasi atau identifikasi tanaman salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap kebenaran yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi tanaman terhadap kepustakaan yang dibuktikan di Universitas Setia Budi Surakarta.

### **2. Pengambilan bahan atau sampel**

Pengambilan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang diperoleh dari daerah Mojosongo, Surakarta pada bulan Januari.

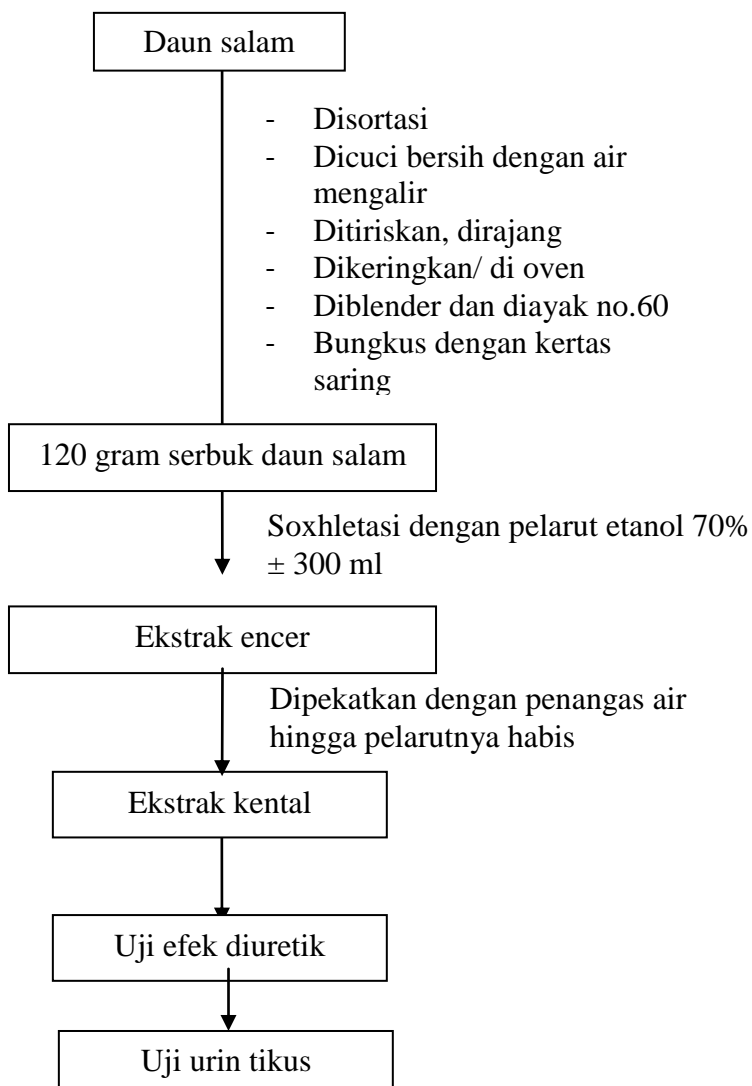
### **3. Pembuatan serbuk daun salam**

Bahan daun salam yang sudah kering segera diserbuk dengan blender, serbuk yang didapat diayak dengan ayakan nomor 60. Penyerbukan ini bertujuan untuk memperluas bidang kontak serbuk dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung efektif (Anonim, 1986).

### **4. Pembuatan ekstrak daun salam**

Pembuatan ekstrak soxhlet serbuk daun salam dilakukan dengan cara sebagai berikut, 120 gram serbuk daun salam dibungkus dengan kertas saring, diikat kedua ujungnya dengan benang. Dimasukkan dalam tabung soxhlet ditambah pelarut  $\pm$  300 ml kemudian melakukan soxhletasi.

Pembuatan ekstrak etanolik daun salam secara skematis dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanolik daun salam.

## 5. Identifikasi zat aktif dalam ekstrak

**5.1. Tannin.** Sebanyak 0.5 gram ekstrak simplisia dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 5 tetes  $\text{FeCl}_3$  5%. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya warna coklat kehijauan.

**5.2. Flavonoid.** Ekstrak daun salam 5 ml ditambah dengan 0,1 gram serbuk Mg, 2 ml larutan alkohol: asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol

dikocok kuat dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan adanya warna merah/ jingga/ kuning pada lapisan amil alkohol.

## **6. Perhitungan dosis**

**6.1. Ekstrak daun salam.** Variasi dosis ekstrak etanolik daun salam yang digunakan dalam penelitian yaitu 18 mg/200 g BB; 36 mg/200 g BB; 54 mg/200 g BB.

**6.2. Kontrol positif.** Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah furosemid yang telah dipercaya oleh masyarakat sebagai obat diuretika dengan dosis 40 mg. Stok suspensi furosemid dibuat dengan cara 1 tablet furosemid kemudian digerus dimasukkan dalam labu takar diencerkan dengan suspensi cmc 20 ml.

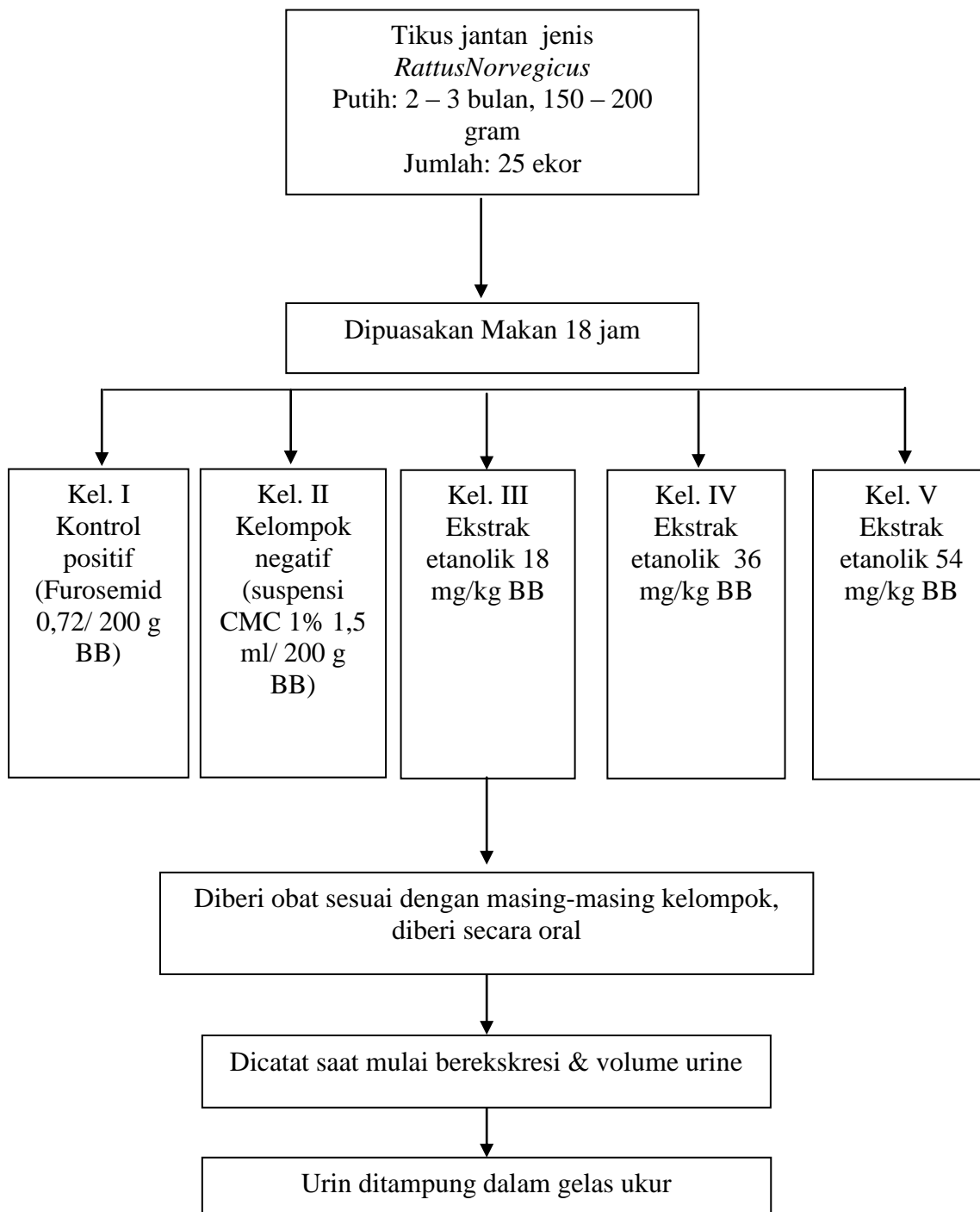
## **7. Pengujian efek diuretika**

Prosedur pengujian efek diuretika ekstrak etanolik daun salam terhadap tikus putih jantan :

- a. Semua tikus dikelompokkan secara acak sesuai dengan kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus dan dipuasakan selama 18 jam sebelum perlakuan namun tanpa diberikan minum.
- b. Masing-masing tikus diberi tanda sesuai dengan kelompok yaitu kelompok pertama sebagai kelompok kontrol negatif dengan pemberian suspensi CMC. Kelompok kedua sebagai kelompok bahan uji yaitu kelompok bahan uji ekstrak etanolik daun salam dan dibagi dalam tiga kelompok dosis. Kelompok ketiga sebagai kelompok kontrol positif dengan pemberian larutan furosemid.

- c. Sebelum diberi obat semua tikus ditimbang. Pada saat pemberian obat atau pada saat waktu ke- 0 dari perlakuan kontrol positif (furosemid) secara oral, perlakuan kontrol negatif (suspensi CMC) secara oral, perlakuan 3 dosis I secara oral, perlakuan 4 dosis II secara oral dan perlakuan 5 dosis III secara oral.
- d. Selesai perlakuan diamati dan catat mula kerja (onset), yaitu waktu dari permulaan diberinya bahan uji sampai tikus mengeluarkan urin dalam satuan menit dan volume urin yang keluar.
- e. Penampungan urin dalam gelas ukur dilakukan untuk uji diuresis, volumenya diukur setelah 6 jam. Parameter yang diukur dan diamati dalam penelitian ini adalah parameter kimia urin meliputi kadar glukosa, protein, urea dan kreatinin. Skema prosedur uji diuretik dapat dilihat pada gambar 2.





**Gambar 2. Skema perlakuan uji diuretika ekstrak etanolik daun salam.**

Keterangan :

Kelompok 1 : kelompok kontrol positif (furosemid 0,72/ 200g BB)

Kelompok 2 : kelompok kontrol negatif (suspensi CMC 1% 1,5 ml/ 200 g BB)

Kelompok 3 : kelompok uji ekstrak etanolik dosis 18 mg /kg BB

Kelompok 4 : kelompok uji ekstrak etanolik dosis 36 mg/kg BB

Kelompok 5 : kelompok uji ekstrak etanolik dosis 54 mg/kg BB

## 8. Analisis kimia urin tikus putih

Prosedur analisis glukosa dan protein pada urin tikus putih jantan dengan mission U120:

- a. Spesimen acak (random)/urin sewaktu dikumpulkan.
- b. Strip reagen (dipstick) di celupkan ke dalam urin dan menarik carik dengan segera. Kelebihan urin diketukkan pada bagian bibir wadah urin.
- c. Ditunggu selama 60 detik dan memegang carik secara horizontal dan mengamati perubahan warna yang terjadi.
- d. Dibandingkan dengan standar warna yang terdapat pada label wadah carik dan dibaca dengan alat mission U120.

Prosedur analisis urea dan kreatinin pada urin tikus putih jantan dengan fotometer stardust FC:

- a. Menghidupkan fotometer dengan menekan tombol ON, maka pada layar akan muncul CODE kemudian menulis angka kode tersebut.
- b. Akan muncul CALIBRATE (Y/N) pilih N
- c. Muncul ASPIRATE 1 ml destilate water.
- d. Muncul INSERT SAMPEL, kemudian memasukkan sampel dengan menekan tombol isap.
- e. Bila telah selesai menekan tombol STOP.
- f. Mematikan tombol OFF.

### **E. Metode Analisis**

Analisis data hasil perhitungan volume urine dengan uji *Kolmogorof-Smirnov*. Dengan tujuan untuk mengetahui bahwa data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Apabila data distribusi normal dan variannya homogen, lalu diolah secara statistik dengan anava satu arah (*one way ANAVA*) untuk menilai antar kelompok apakah ada perbedaan yang bermakna sehingga dapat disimpulkan adanya aktifitas obat uji. Dilanjutkan dengan Dunnet T3 / LSD (*least significant difference*) untuk membandingkan perbedaan mean antar kelompok perlakuan (Scheffler, 1987).