

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi adalah keseluruhan obyek penelitian atau obyek yang diteliti. Populasi pada penelitian ini adalah herba ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang diperoleh pada bulan Oktober 2018 dari petani daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang dianggap mewakili seluruh populasi dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba ciplukan sebanyak 10 kg berat basah.

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

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

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak air herba ciplukan yang diperoleh dari simplisia kering yang diserbuk.

Variabel kedua dalam penelitian ini adalah pemeriksaan tekanan darah terhadap tikus yang diinduksi prednison dan NaCl.

Variabel ketiga dalam penelitian ini adalah pemberian dosis tunggal ekstrak air herba ciplukan 7 mg/KgBB, 15 mg/KgBB dan 30 mg/KgBB.

Variabel keempat dalam penelitian ini adalah pengukuran tekanan darah dengan metode *tail cuff* menggunakan alat non invasif CODA®.

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

Variabel utama dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yakni variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak air herba ciplukan yang diperoleh dengan metode infundasi.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria peneliti. Variabel tergantung yang digunakan dalam penelitian ini adalah tekanan darah hewan uji setelah diberi perlakuan.

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah peneliti, kondisi laboratorium, kondisi hewan uji yang meliputi berat badan, usia, dan herba ciplukan.

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

Pertama, herba ciplukan adalah tanaman ciplukan basah yang diperoleh dari petani daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Oktober 2018.

Kedua, serbuk herba ciplukan adalah tanaman ciplukan yang dikeringkan, kemudian diserbuk menjadi serbuk yang diayak dengan ayakan mesh 40.

Ketiga, ekstrak air herba ciplukan adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian metode infundasi menggunakan pelarut air sebagai cairan penyari lalu dilakukan pengeringan beku dengan *freeze drying*.

Keempat, aktivitas antihipertensi adalah kemampuan ekstrak air dari herba ciplukan dalam menurunkan tekanan darah sistolik dan tekanan darah diastolik pada tikus jantan yang diinduksi prednison dan NaCl.

Kelima, tikus yang dipakai adalah tikus putih jantan galur Sprague-Dawley dengan berat badan 200-300 g yang diinduksi prednison dan NaCl.

Keenam, dosis efektif adalah dosis dari ekstrak air daun ciplukan yang dapat menurunkan tekanan darah paling optimal tetapi tidak menimbulkan hipotensi.

Ketujuh, metode uji *tail cuff* adalah metode pengukuran tekanan darah dengan menggunakan alat non invasif CODA®.

### C. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat yang digunakan adalah alat pengukur tekanan darah darah (*Non Invasive Blood Pressure System*) dari CODA®, batang pengaduk, mortir, stamper, alat-alat gelas, spuit 5 ml, timbangan tikus, timbangan analitik, *freeze drying*, panci infusa, dan oven

#### 2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah herba ciplukan yang diperoleh dari petani daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Bahan yang digunakan untuk menginduksi adalah prednison 1,5 mg/kg BB dan NaCl 200 mg/kg BB. Bahan kimia yang diberikan pada kontrol positif adalah captopril dan kontrol negatif menggunakan aquadest. Hewan yang digunakan untuk uji antihipertensi adalah tikus putih jantan galur Sprague-dawley dengan usia 2-3 bulan dan berat badan 200–300 g.

### D. Jalannya Penelitian

#### 1. Determinasi herba ciplukan

Determinasi dan deskripsi tanaman digunakan untuk mengetahui kebenaran sampel herba ciplukan yang akan digunakan pada penelitian ini. Determinasi dan identifikasi dilakukan berdasarkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman terhadap kepustakaan yang dibuktikan di Universitas Setia Budi Surakarta.

#### 2. Pengeringan simplisia

Herba ciplukan dikumpulkan, disortasi basah kemudian dicuci dengan air bersih lalu ditiriskan. Herba ciplukan kemudian dikeringkan dengan pengering oven pada suhu 30°C-90°C. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air, sehingga mencegah terjadinya pembusukan oleh cendawan atau bakteri, selain itu bahan yang telah dikeringkan akan lebih mudah diserbukkan dan tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan untuk jangka waktu lama (Agoes 2009).

#### 3. Pembuatan serbuk

Pembuatan serbuk simplisia merupakan proses awal pembuatan ekstrak. Serbuk simplisia yang dibuat dari simplisia utuh atau potongan-potongan halus

simplisia yang sudah dikeringkan melalui proses pembuatan serbuk dengan suatu alat tanpa menyebabkan kerusakan atau kehilangan kandungan kimia yang dibutuhkan, kemudian diayak hingga diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan tertentu. Derajat kehalusan serbuk simplisia terdiri dari serbuk sangat kasar, kasar, agak kasar, halus dan sangat halus (Kemenkes RI 2013). Penelitian ini menggunakan pengayak mesh 40 dengan derajat serbuk agak kasar, kemudian ditimbang untuk menentukan bobot persen kering terhadap bobot basah.

#### **4. Penetapan susut pengeringan serbuk herba ciplukan**

Penetapan susut serbuk herba ciplukan dilakukan di Laboratorium Formulasi Farmasi Universitas Setia Budi, dengan cara serbuk ditimbang sebanyak 2 g, kemudian diukur menggunakan *moisture balance*. Hasil penetapan susut pengeringan dihitung dalam satuan (%) kadar yang terukur (Kemenkes RI 2013).

#### **5. Pembuatan ekstrak air herba ciplukan**

Dari 200 gram berat serbuk simplisia herba ciplukan dimasukkan dalam panci kemudian diberi aquadest sebanyak 1000 ml. Kemudian dipanaskan diatas tangas air selama 15 menit terhitung mulai suhu mencapai 90°C sambil sekali diaduk. Dilakukan penyaringan menggunakan kain flanel atau corong buchner. Selanjutnya residu ditambah air sebanyak 500 ml dan dilakukan proses ekstraksi seperti diatas. Hasil infusa dilakukan pengeringan beku dengan *freeze dryer* (Luliana *et al.* 2017).

#### **6. Penetapan organoleptis ekstrak air herba ciplukan**

Penetapan organoleptis pada ekstrak herba ciplukan dengan mengamati warna, bau, dan bentuk dari ekstrak air daun herba ciplukan (Kemenkes RI 2010).

#### **7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak air herba ciplukan**

Identifikasi senyawa kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam ekstrak herba ciplukan. Identifikasi senyawa kimia dilakukan menggunakan metode tabung di Laboratorium Fitokimia Farmasi Universitas Setia Budi.

**7.1 Identifikasi senyawa flavonoid.** Sebanyak 2 mg ekstrak ditambahkan dengan air panas secukupnya, kemudian dididihkan selama 5 menit lalu disaring.

Filtrat sebanyak 5 ml ditambahkan serbuk M g dan HCl pekat 2 N, kemudian dikocok kuat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga (Lumbessy *et al.* 2013).

**7.2 Identifikasi senyawa alkaloid.** Sebanyak 2 ml ekstrak dilarutkan dilarutkan dengan HCl 2 N dan disaring. Larutan yang diperoleh dibagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff, tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer dan tabung ketiga ditambahkan pereaksi Wagner. Pada pereaksi Dragendorff akan terbentuk endapan berwarna jingga, pereaksi Mayer akan terbentuk endapan kuning yang menandakan positif adanya alkaloid dan pereaksi Wagner akan terbentuk warna endapan kuning atau merah kecoklatan (Tiwari *et al.* 2011).

**7.3 Identifikasi senyawa tanin.** Identifikasi tanin dapat dilakukan dengan cara melarutkan 1 g ekstrak masing-masing dengan 100 ml air panas kemudian mendidihkan selama 5 menit, didinginkan, disaring dan diambil filtratnya sebanyak 5 ml. Memasukkan filtrat dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Tanin dapat dikatakan positif apabila terbentuk warna violet atau hijau kehitaman (Sarker 2006).

**7.4 Identifikasi senyawa steroid.** Ekstrak ditambahkan dengan satu tetes *Liebermann-Burchard* yang terdiri dari 1 ml asam asetat encer dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan diatas penangas air. Jika terbentuk warna merah lalu berubah hijau, ungu dan terakhir biru maka menunjukkan positif steroid dan triterpenoid (Sarker 2006).

## 8. Penetapan dosis

**8.1 Dosis captopril.** Dosis captopril dihitung dengan dosis lazim. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 g adalah 0,018. Dosis terapi untuk manusia 70 kg adalah 25 mg. Dosis untuk tikus (rata-rata 200 g) =  $25 \text{ mg} \times 0,018 = 0,45 \text{ mg}/200 \text{ g}$  BB tikus.

**8.2 Dosis ekstrak air herba ciplukan.** Berdasarkan dosis empiris sebelumnya yaitu 5 g berat kering. Dosis ekstrak yang diperoleh setelah proses infundasi dengan perbandingan 200 g serbuk simplisia dengan 1000 ml air, diperoleh dosis untuk herba ciplukan ini adalah 7 mg, 15 mg, dan 30 mg/kg BB.

Dimana dosis diperoleh dari variasi dosis dengan setengah dosis ekstrak 7 mg, satu kali dosis ekstrak 15 mg, dan dua kali dosis ekstrak dan 30 mg/kg BB

**8.3 Dosis prednison.** Dosis prednison yang digunakan untuk meningkatkan tekanan darah pada tikus adalah 1,5 mg/kg BB. Dosis untuk tikus rata-rata 200 g =  $1,5/1000 \times 200 = 0,3$  mg/ 200 g BB tikus.

**8.4 Dosis NaCl.** Dosis NaCl yang digunakan untuk meningkatkan tekanan darah pada tikus adalah 200 mg/kg BB. Dosis untuk tikus rata-rata 200 g =  $200/1000 \times 200 = 40$  mg /200 g BB tikus.

## 9. Penetapan larutan uji

**9.1 Larutan aquadest.** Diukur aquadest 5 ml karena total pemberian kontrol positif prednison dan NaCl 5 ml maka untuk kontrol negatif menggunakan volume yang sama yaitu sebanyak 5 ml aquadest per tikus.

**9.2 Larutan captopril.** Ditimbang serbuk captopril sebanyak 5 g. Dimasukkan kedalam labu ukur kemudian dilarutkan dengan aquadest hingga homogen, dicukupkan volumenya hingga 100 ml.

**9.3 Larutan prednison.** Ditimbang tablet prednison sebanyak 2 tablet. Setelah itu semua tablet digerus hingga halus dan homogen. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur dilarutkan dengan aquadest sedikit demi sedikit hingga homogen, dicukupkan volumenya hingga 100 ml.

**9.4 Larutan NaCl.** Ditimbang 2 gram NaCl, dimasukkan dalam labu ukur, ditambahkan sedikit demi sedikit aquadest sampai homogen kemudian dicukupkan volumenya hingga 100 ml.

## 10. Perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan yaitu tikus jantan *Srage-dawley* yang berusia 2-3 bulan dengan berat badan 200-300 g, sebanyak 25 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Tiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus dan masing-masing diberi tanda pengenal. Sebelum perlakuan tikus diadaptasi selama  $\pm 14$  hari dikandang dan dialat uji guna untuk membiasakan hewan tikus pada keadaan sekitar, setelah diadaptasi kurang lebih selama 14 hari dan dipuaskan selama 12 jam, diukur tekanan darah awal tikus. Kemudian tikus diinduksi hipertensi oleh NaCl 200 mg/kg BB dan prednisone 1,5 mg/kg BB secara oral selama 21 hari dan dilanjutkan selama 21 hari terapi (total 42 hari).

Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu :

- Kelompok I : Kontrol negatif aquadest
- Kelompok II : Kontrol positif captopril
- Kelompok III : Ekstrak air herba ciplukan 7 mg/200 g BB tikus
- Kelompok IV : Ekstrak air herba ciplukan 15 mg/200 g BB tikus
- Kelompok V : Ekstrak air herba ciplukan 30 mg/200 g BB tikus

### **11. Cara pengukuran tekanan darah**

Pengukuran tekanan darah dilakukan dengan cara *tail cuff methode* menggunakan *blood pressure analyzer*. Terlebih dahulu tikus dimasukkan kedalam restainer (kandang individual) yang berukuran tepat untuk satu tubuh tikus dengan ekor menjuntai keluar, kemudian ekor tikus dijepit dengan alat *pressure kit* lalu dihubungkan pada *pressure meter*, untuk mengetahui tekanan darah sistolik dan diastolik. Prinsip kerja pengukuran tekanan darah adalah *cuff* digelembungkan sampai mencapai tekanan darah diatas tekanan darah sistolik, sehingga nadi menghilang kemudian tekanan *cuff* dikurangi perlahan-lahan. Pada saat tekanan darah mencapai tekanan sistolik nadi akan muncul pada layar kaca monitor.

### **12. Prosedur uji antihipertensi**

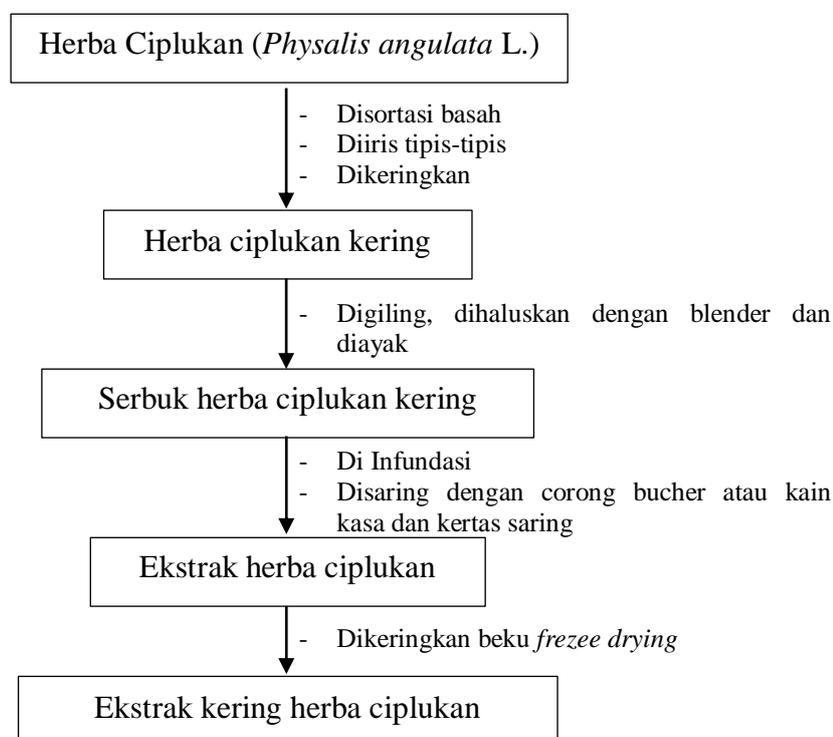
Hewan uji ditimbang dan dikelompokan, tiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus masing-masing diberi tanda pengenal. Tikus diadaptasi selama  $\pm 14$  hari dan ditempatkan pada kandang yang bersih dan ventilasi yang baik. Setelah diadaptasi kurang lebih selama 14 hari dan dipuaskan selama 12 jam, diukur tekanan darah awal tikus kemudian tikus diinduksi hipertensi oleh NaCl 200 mg/kg BB dan prednisone 1,5 mg/kg BB secara oral selama 21 hari dan dilanjutkan selama 21 hari terapi (total 42 hari). Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu: Kontrol negatif aquadest, kontrol positif captopril (pembanding), ekstrak air herba ciplukan 7 mg/200 g BB tikus, ekstrak air herba ciplukan 15 mg/200 g BB tikus, ekstrak air herba ciplukan 30 mg/200 g BB tikus. Pengukuran dilakukan menggunakan *tail cuff methode* menggunakan *blood pressure analyzer* oleh CODA Instrument®. Pengukuran dilakukan sebelum induksi (0 hari [T0]), selama induksi; Induksi hari ke-7 (T1), induksi hari ke-14 (T2), induksi hari ke-21 (T3) dan selama terapi: Terapi hari ke-28 (T4), terapi hari ke-35 (T5) dan terapi

hari ke-42 (T6). Hasil masing-masing kelompok dibandingkan dengan kelompok kondisi yang berbeda dan kelompok lainnya.

### E. Analisis Data

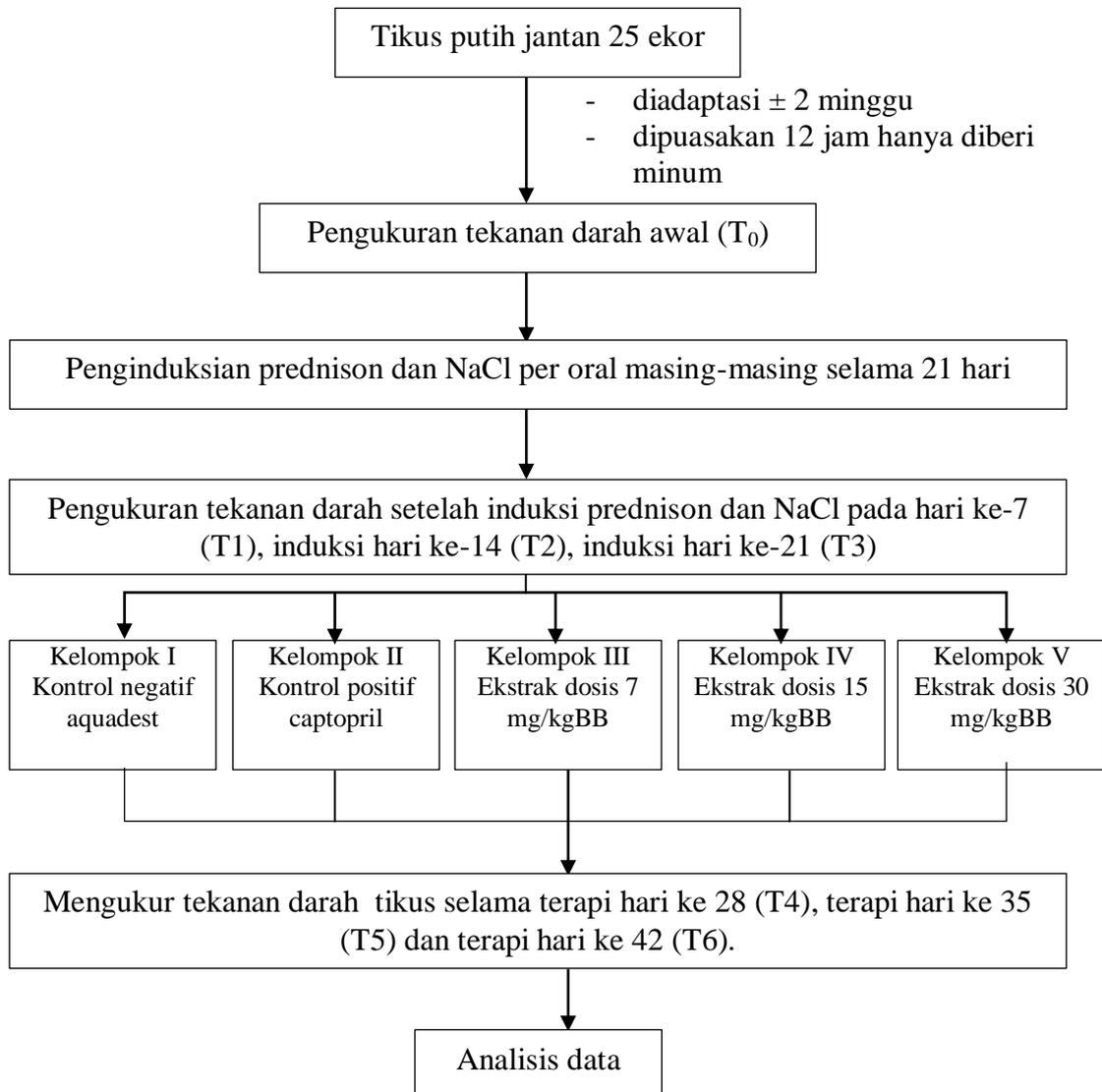
Untuk mengetahui apakah ada perbedaan tekanan darah yang signifikan dan hasil pengukuran tekanan darah kelompok perlakuan uji normalitas dilakukan uji hipotesis. Uji hipotesis dilakukan dengan metode parametrik atau non parametrik. Uji normalitas data dilakukan dengan uji Kolmogorov-Smirnov apabila nilai signifikansi (*asym.sig*) lebih dari 0,05 maka data terdistribusi normal, sebaliknya jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 maka data tidak terdistribusi normal. Jika hasil terdistribusi normal, maka uji dilakukan dengan metode statistik parametrik *Two Way ANOVA* dua arah dan dilanjutkan dengan uji *post hoc test* yaitu uji *Tukey* tergantung nilai homogenitas variannya. Hasil tidak terdistribusi normal, maka uji hipotesis menggunakan metode *Kruskall wallis* (Awanda 2017).

### F. Pembuatan Ekstrak Herba Ciplukan



Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak air herba ciplukan

### G. Skema Penelitian



Gambar 5. Skema Jalannya Penelitian