

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi Sampel

A. Populasi

Populasi daun cincau hijau (*Cyclea barbata* Miers) didapatkan di daerah Tawamangu, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan adalah daun cincau hijau yang diambil secara acak dengan memilih daun cincau hijau yang tidak terlalu muda, masih segar.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah pertama, ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata* Miers). Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah efek diuretik pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar.

2. Klasifikasi variabel utama

2.1 Variabel utama

Variabel utama adalah identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama yang diidentifikasi dapat diklasifikasikan menjadi variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

2.2 Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata* Miers).

2.3 Variabel terkendali

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, galur, lingkungan hidup, jenis kelamin, kondisi laboratorium.

2.4 Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek diuretik tikus jantan setelah diberi ekstrak etanol daun cincau hijau.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun cincau hijau yang diambil dari Tawamangu, Jawa Tengah. Daun cincau hijau yang digunakan yang masih segar, berwarna hijau, belum layu, bersih dan bebas dari penyakit.

Kedua, ekstrak daun cincau hijau adalah ekstrak yang didapat dan diproses dengan metode maserasi. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut, beberapa pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar. Maserasi berarti dilakukan pengulangan

penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya (Widyastu, 2010).

Ketiga, hewan uji adalah tikus jantan galur wistar. Berumur 2-3 bulan, sehat dan berat badan berkisar 200-250 gram, yang diperoleh dan Laboratorium Universitas Setia Budi.

Keempat, Uji efek diuretik pada penelitian ini dimulai dengan pemberian air hangat pada setiap kelompok tikus. Pemberian air hangat pada hewan percobaan dimaksudkan untuk memperjelas efek diuretik yang terjadi. Volume normal urin tikus tanpa pemberian sejumlah air sangat kecil yaitu satu ml per jam (Nurhayati, 1980:29).

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini yaitu oven, timbangan analitik, gelas ukur, corong, pralon, kandang tikus lengkap dengan tempat makan minum, canule untuk pemberian oral.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah ekstrak daun cincau hijau yang dimaserasi dengan etanol 95%, CMC 0,5%, furosemid, serbuk magnesium, HCL, FeCL, reagen Dragendroff.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tahap pertama dalam melakukan penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman daun cincau hijau yang berkaitan dengan morfologi tanaman terhadap kepustakaan. Determinasi tanaman daun cincau hijau dilakukan di Laboratorium Morfologi Sistemika dan Tumbuhan Universitas Setia Budi, Surakarta.

2. Pengambilan Tanaman, Pengeringan Dan Penyerbukan

Bahan simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cincau hijau yang didapatkan di daerah Tawamangu, Jawa Tengah. Daun cincau hijau yang sudah diambil lalu dicuci dengan air bersih kemudian ditiriskan. Setelah ditiriskan kemudian dikeringkan dan dianginkan, sesudah kering kemudian diblender dan diayak menggunakan pengayak nomor 40.

3. Penetapan kadar kelembaban

Penetapan kadar kelembaban daun cincau hijau dilakukan di Laboratorium Toksikologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta dengan menggunakan alat moisture balance. Caranya dengan menimbang serbuk daun cincau hijau sebanyak 2 gram kedalam alat moisture balance pada suhu 105°C dan ditunggu sampai memberikan tanda bunyi. Angka yang tertera pada alat moisture balance adalah persen kadar air yang dihasilkan oleh serbuk daun cincau hijau selama proses pemanasan. Kadar air yang dihasilkan oleh serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10 % (Depkes, 1985).

4. Pembuatan Ekstrak Daun Cincau Hijau

Serbuk daun cincau hijau ditimbang sesuai dosis yang diinginkan, kemudian dicampurkan dengan etanol 96 % sesuai dengan perbandingan (1 : 7,5) dengan serbuk daun cincau hijau 500 gram. Selanjutnya masukkan serbuk ke dalam botol yang berwarna gelap, setelah itu proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut etanol dan lakukan beberapa pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar dan terhindar dari cahaya matahari secara langsung.

5. Identifikasi Kandungan Kimia

5.1 Identifikasi Flavonoid. Sampel sebanyak 0,5 gram, 1-2 ml air panas dan sedikit serbuk Mg dimasukkan ke dalam lubang kemudian ditambahkan 4-5 tetes HCL 1 % dan etanol 96%, kocok hingga tercampur apabila timbul warna merah, kuning, atau jingga maka ekstrak daun cincau hijau positif mengandung flavonoid (Lathifah, 2008).

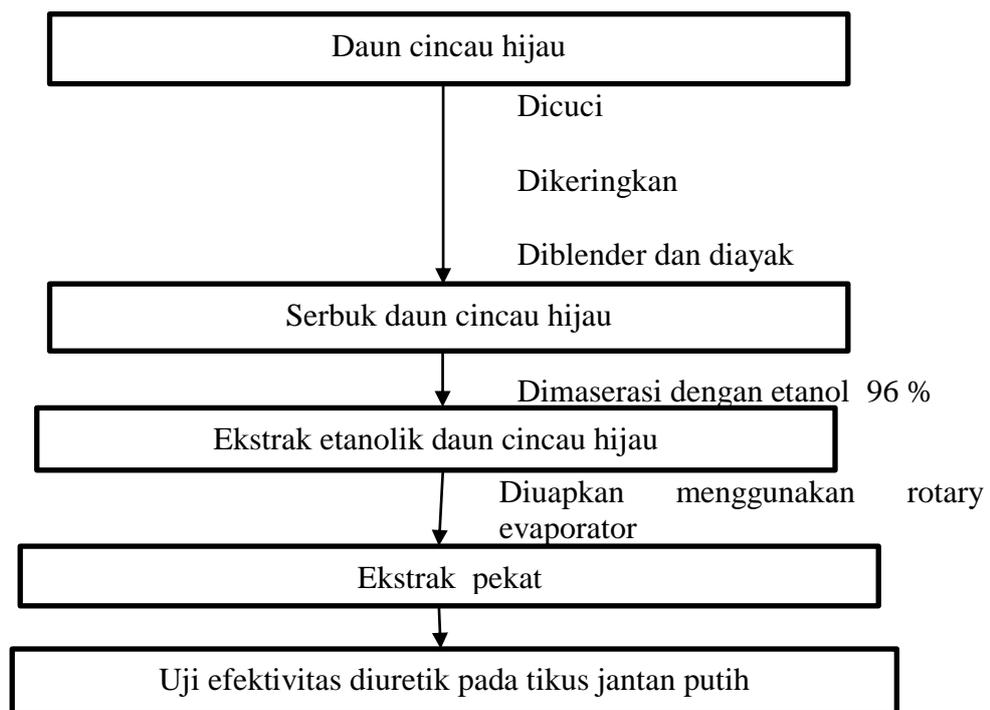
5.2 Identifikasi Saponin. Sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung dan ditambahkan air sebanyak 0,5 ml kemudian dikocok selama 1 menit, apabila timbul busa ditambahkan HCL 1%. Jika busa tetap stabil selama 10 menit maka ekstrak daun cincau hijau positif mengandung saponin (Lathifah, 2008).

5.3 Identifikasi Tanin. Sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung dan ditambahkan 5 tetes FeCl_3 b/v, apabila menghasilkan warna coklat kehitaman maka ekstrak daun cincau hijau positif mengandung tanin (Lathifah, 2008).

5.4 Identifikasi Alkaloid. Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara sampel simplisia sebanyak 500 mg dilarutkan dalam 100 ml air panas, kemudia didinginkan dan di saring. Filtrat sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambah dengan 1,5 ml HCL 1% kemudian dilanjutkan dengan penambahan 2 sampai 4 tetes reagen Dragendroff, Alkaloid positif terjadi kekeruhan ataupun endapan coklat (Harbone 1987).

6. Pembuatan CMC 0,5%

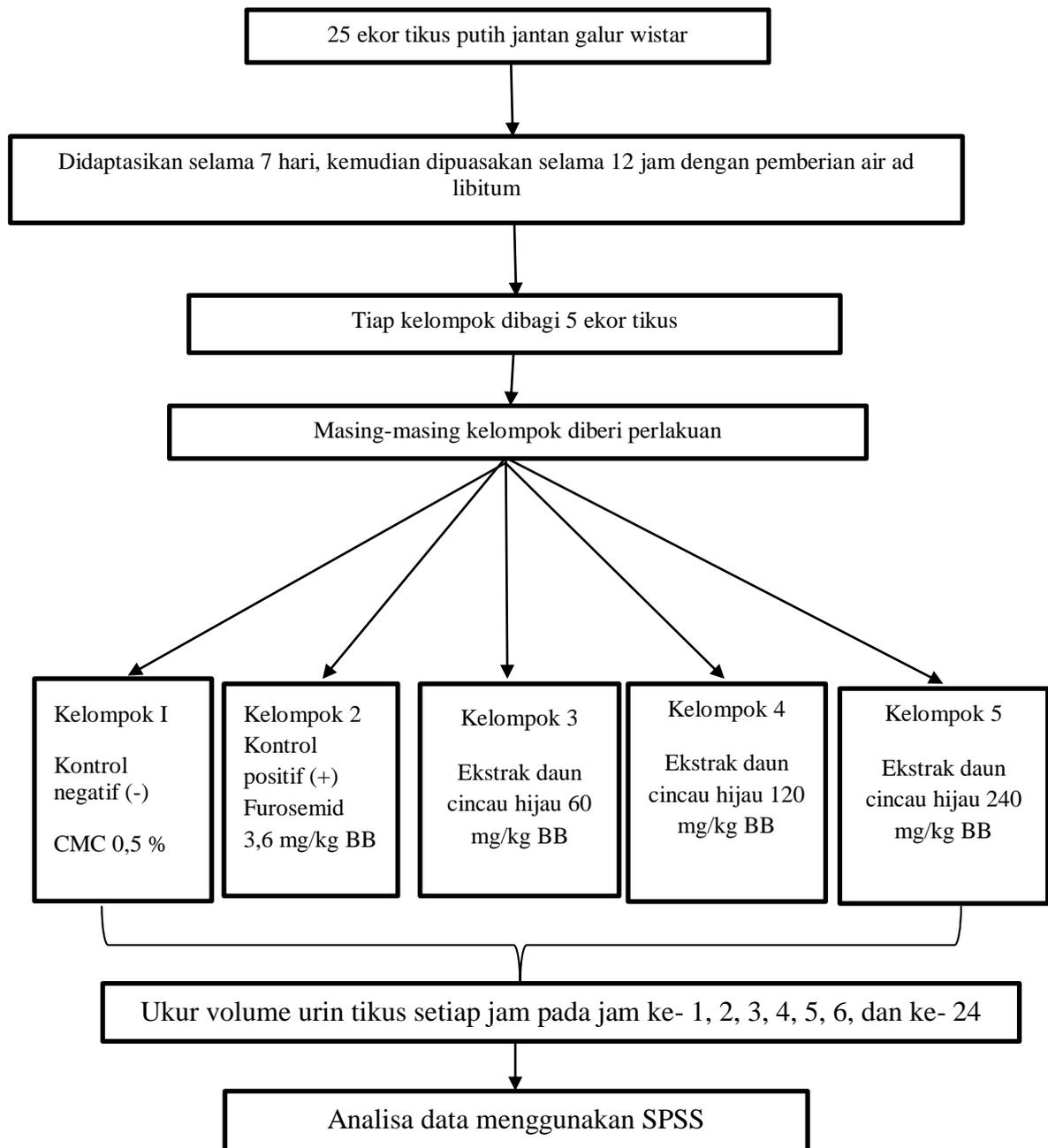
Pembuatan larutan CMC 0,5% dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram lalu dimasukkan ke dalam air sampai volume kurang lebih 100 ml, sehingga didapatkan konsentrasi 0,5%. Larutan ini akan digunakan sebagai suspensi furosemide, ekstrak etanol daun cincau hijau yang diberikan secara peroral pada tikus



Gambar 5. Skema kerja pembuatan ekstrak etanol 96% daun cincau hijau

7. Perlakuan dan pengelompokan hewan uji

Tikus ditimbang dan masing – masing diberi tanda, tikus yang digunakan sebanyak 25 ekor. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar yang berumur 2-3 bulan dengan berat rata – rata 170-200 g.



Gambar 6. Skema Penelitian

8. Pengujian aktivitas diuretik

Metode uji diuretik yang digunakan adalah metode Lipschitz 1943 dengan modifikasi (Afifah *et al* 2013). Pada metode ini sebanyak 25 ekor tikus putih jantan galur wistar dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, dimana masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor, dimana kelompok pertama sebagai kelompok kontrol yang hanya diberi CMC Na 0,5%, kelompok kedua sebagai kelompok pembanding yang diberi furosemid 3,6 mg/kg BB, kelompok ketiga adalah ekstrak daun cincau hijau 60 mg/kg BB, kelompok empat adalah ekstrak daun cincau hijau 120 mg/kg BB dan kelompok lima ekstrak daun cincau hijau 240 mg/kg BB.

Pada metode ini hewan uji dipuasakan selama 12 jam sebelum dilakukan pengujian dengan tetap diberikan minum, semua tikus pada kelompok percobaan diberi NaCL fisiologis sebanyak 4 ml/200 g BB tikus sebagai loading dose oral. Setelah 30 menit masing – masing kelompok diberikan sediaan uji sesuai dengan kelompoknya. Setelah pemberian larutan uji, tikus ditempatkan dalam kandang metabolisme individual dan volume urin yang diekskresikan dicatat setiap 1 jam selama 24 jam (Vogel 1990).

E. Analisis Hasil

Data yang diambil pada uji aktivitas diuretik adalah data onset, volume urin, dan EUV. Data onset adalah waktu hewan uji mulai berkemih, volume urin adalah urin yang diambil pada jam ke 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 24.

Data yang diperoleh terlebih dahulu diuji *Kolmogorov-smirnov*. Bila data terdistribusi normal dan variannya homogen, maka dilakukan uji one way Anova. Bila hasil analisis menunjukkan perbedaan makna, maka dilanjutkan dengan uji post hoc *LSD* dan *Tukey*.

