

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

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

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun cincau hijau (*Cyclea barbata* Miers).

Variabel utama kedua adalah pengaruh efek diuretik pada tikus putih jantan galur wistar.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel yang telah diteliti terlebih dahulu dapat diklasifikasikan kedalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah ekstrak daun cincau hijau (*Cyclea barbata* Miers) dengan berbagai dosis yang diberikan pada tikus putih jantan.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kondisi fisik hewan yang meliputi badan, lingkungan, jenis kelamin, usia, kondisi percobaan, laboratorium dan peneliti.

Variabel terikat adalah variabel yang terjadi akibat dari variabel utama. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pengaruh kadar Na^+ dan K^+ dalam urin yang diukur menggunakan metode *Atomic Absorption Spectrophotometry* (AAS).

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun cincau hijau (*Cyclea barbata* Miers) yang diambil secara acak di daerah Solo, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak daun cincau hijau (*Cyclea barbata* Miers) adalah hasil ekstraksi dari daun cincau hijau (*Cyclea barbata* Miers) dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang kemudian diuapkan sampai menjadi pekat.

Ketiga, tikus putih jantan galur wistar adalah hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini, umur 2-3 bulan, berat 150-200 gram.

Keempat, dosis ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata* Miers) adalah tiga macam variasi dosis, yaitu 60 mg/kg BB, 120 mg/kg BB, dan 240 mg/kg BB.

Kelima, diuretik adalah peningkatan volume urin yang dikeluarkan tikus putih jantan galur wistar.

Keenam, pengukuran kadar Na^+ dan K^+ adalah pengukuran kadar logam Na^+ pada panjang gelombang 589,0 nm dan kandungan K^+ pada panjang gelombang 766,5 nm yang dilakukan dengan metode destruksi basah yang diukur menggunakan alat *Atomic Absorption Spectrophotometry* (AAS).

Ketujuh, dosis efektif adalah dosis yang berbeda bermakna terhadap kontrol negatif (CMC) dan sebanding terhadap kontrol positif (furosemide) serta memberikan efek pengeluaran Na^+ dan K^+ terbesar.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan membuat simplisia adalah pisau, timbangan elektrik, oven, mesin penggiling, dan ayakan mesh nomor 40. Alat penyari yang digunakan adalah 1 set ekstraksi dan *evaporator*. Alat untuk identifikasi kandungan kimia yang digunakan adalah tabung reaksi dan alat-alat gelas. Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji antara lain tempat penampung urin tikus, kandang metabolik, timbangan analitik, *handscoon*, spuit oral. Alat yang digunakan untuk mengukur kadar Na^+ dan K^+ dalam urin adalah *Automatic Absorption Spectrophotometry* (AAS).

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah daun cincau hijau yang diambil secara acak dengan memilih daun cincau hijau yang masih segar dan tidak terlalu muda. Bahan kimia yang digunakan adalah obat Furosemid yang diperoleh dari apotek. CMC yang diperoleh dari laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Bahan yang digunakan untuk pengukuran kadar Na^+ dan K^+ dalam urin adalah standar Na^+ 1000 ppm, standar K^+ 1000 ppm, HNO_3 8M dan aqua bidestilata. Bahan untuk identifikasi kandungan kimia antara lain reagen Dragendrof, amil alkohol, serbuk magnesium, HCl 2N, dan FeCl_3 .

3. Binatang percobaan

Binatang yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar dengan berat berkisar 150-200 gram dengan umur 2-3 bulan sebanyak 25 ekor tikus yang dibagi ke dalam 5 kelompok perlakuan, yang diperoleh dari laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama dengan melakukan determinasi tanaman daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*). Determinasi bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel yang digunakan dalam penelitian yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman daun cincau hijau terhadap kepustakaan yang dibuktikan di Laboratorium Morfologi Sistematika Tumbuhan Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan bahan atau sampel

Daun cincau hijau yang masih segar dan tidak terlalu muda dicuci dengan air dan dibersihkan dari kotoran yang masih menempel.

3. Pengeringan dan pembuatan serbuk

Daun cincau hijau dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C sampai kering, kemudian sampel diserbukkan dengan bantuan alat mesin penggiling lalu hasil yang diperoleh diayak dengan menggunakan ayakan mesh nomor 40 dan ditimbang. Hasil yang sudah diayak dimasukkan ke dalam wadah.

4. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan serbuk daun cincau hijau menggunakan alat *moisture balance*. Suhu atau temperatur yang digunakan sebesar 105°C dan waktu pengeringan secara manual hingga kering. Ditimbang ekstrak sebanyak 1 g dan dimasukkan kedalam kurs porselin tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditera. Sebelum ditimbang, ekstrak diratakan dalam kurs porselin, dengan menggoyangkan kurs hingga membentuk lapisan setebal 5–10 mm. Masukkan kedalam oven, buka tutupnya, keringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Dinginkan dalam eksikator. Lakukan replikasi sebanyak 3 kali kemudian dihitung persentasenya (Yuri Pratiwi Utami *et. al.*, 2016).

5. Pembuatan ekstrak etanol daun cincau hijau

Ekstrak etanol daun cincau hijau dibuat dengan metode maserasi yaitu dengan cara serbuk daun cincau hijau sebanyak 10 bagian simplisia dari 500 gram dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap, lalu direndam menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 75 bagiannya yaitu 3,750 liter, kemudian ditutup dan didiamkan selama 5 hari dengan sesekali penggojokan. Maserasi dilakukan selama 5 hari setelah itu disaring dan residu diperas. Hasil yang diperoleh dipekatkan dengan evaporator sampai menjadi ekstrak kental.

6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun cincau hijau

Senyawa kimia yang terdapat pada daun cincau hijau adalah flavanoid, alkaloid, saponin, dan tanin. Identifikasi senyawa yang terdapat pada daun cincau direaksikan dengan reagen-reagen kimia tertentu.

6.1 Identifikasi flavonoid. Sejumlah 1 mL ekstrak ditambahkan 2 mL metanol. Filtrat sejumlah 1 mL ditambahkan dengan 1 mg serbuk Mg, 0,5 mL HCl pekat, dan 1 mL amil alkohol kemudian dikocok kuat. Bila lapisan amil alkohol berwarna jingga atau merah jingga berarti sampel mengandung flavonoid (Sulasiyah *et al.*, 2018).

6.2 Identifikasi saponin. Sejumlah 1 mL ekstrak ditambahkan 2 mL metanol. Kemudian dilakukan pemanasan hingga hampir mendidih lalu larutan dikocok kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang tidak hilang selama \pm 5 menit dan dengan penambahan 1 tetes HCl 2 N buih juga tidak hilang, maka sampel mengandung saponin (Sulasiyah *et al.*, 2018).

6.3 Identifikasi tanin. Sejumlah 1 mL ekstrak ditambahkan 2 mL metanol kemudian disaring. Sebagian filtrat yang diperoleh ditambah 2 tetes FeCl₃. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna coklat kemerahan (Sulasiyah *et al.*, 2018).

6.4 Identifikasi alkaloid. Sejumlah 2 mL ekstrak ditambahkan 2 mL HCl dan 4 mL metanol dipanaskan pada 95°C selama 5 menit kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut:

- 1 mL filtrat ditambahkan 2 tetes reagen Mayer. Hasil positif dengan terbentuknya endapan berwarna putih.
- 1 mL filtrat ditambahkan 2 tetes reagen Dragendorff. Hasil positif dengan terbentuknya endapan jingga coklat (Sulasiyah *et al.*, 2018).

7. Penentuan dosis

7.1 Pembuatan CMC 0,5%. Larutan CMC dengan konsentrasi 0,5% dibuat dengan cara melarutkan 1000 mg serbuk CMC sedikit demi sedikit dilarutkan dalam 100 ml aquadest panas sambil di aduk sampai semua terlarutkan.

7.2 Penetapan dosis ekstrak etanol daun cincau hijau. Variasi dosis yang digunakan dalam penelitian ada tiga macam, dosis pertama yaitu 60 mg/kg BB, dosis kedua yaitu 120 mg/kg BB, dan dosis ketiga yaitu 240 mg/kg BB..

7.3 Penetapan dosis Furosemid. Dosis furosemid yang diberikan pada tikus adalah 3,6 mg/kg BB.

8. Perlakuan dan penetapan hewan uji

Tikus yang digunakan sebanyak 25 ekor masing-masing ditimbang dan diberi tanda dan dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam sebelum diberi perlakuan, kemudian diberi air hangat 2 ml/200 gram berat badan tikus (*loading dose*) (Lumba, 2019).

Kelompok I : Kelompok ekstrak etanol daun cincau hijau 60 mg/kg BB.

Kelompok II : Kelompok ekstrak etanol daun cincau hijau 120 mg/kg BB.

Kelompok III : Kelompok ekstrak etanol daun cincau hijau 240 mg/kg BB.

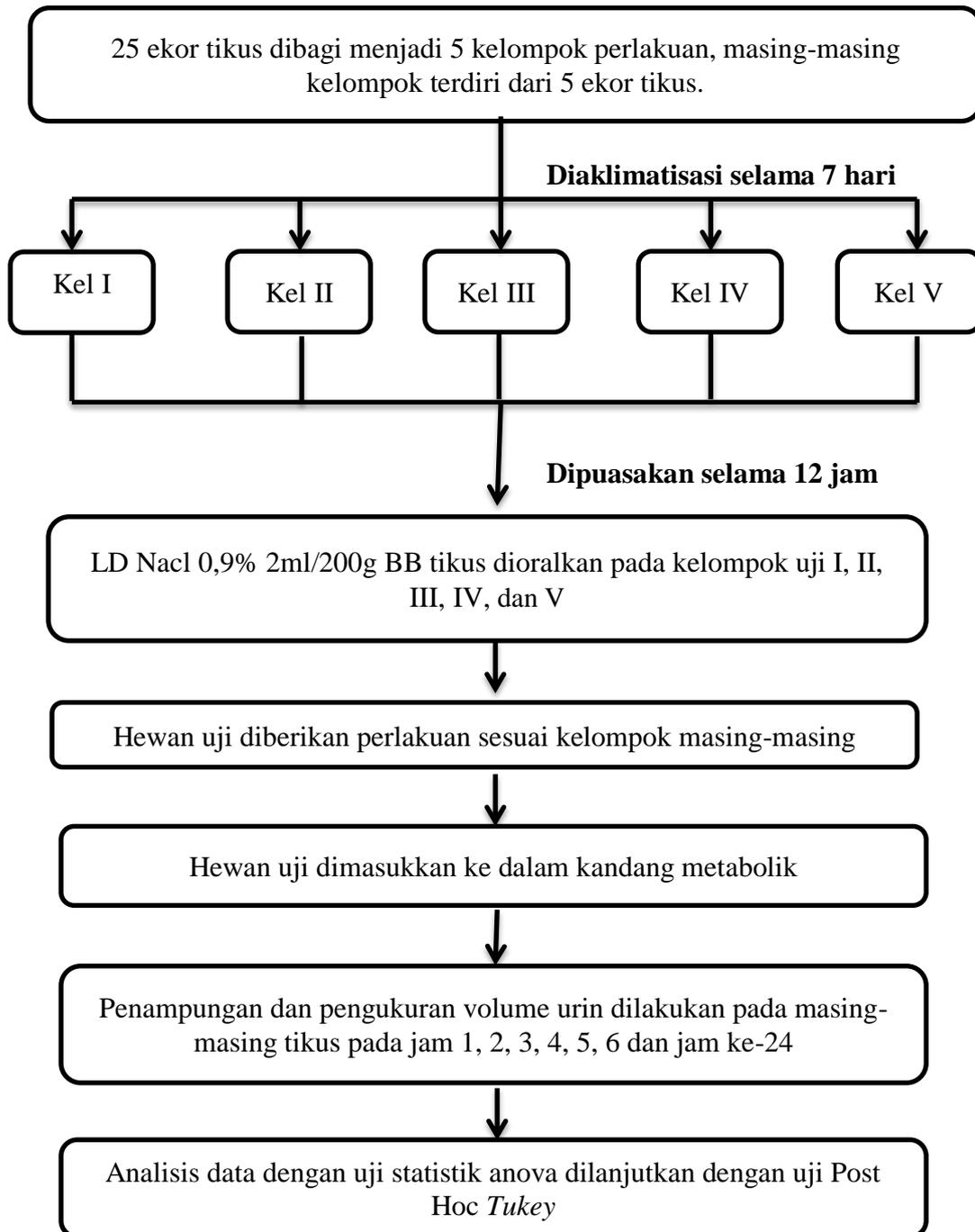
Kelompok IV : Kelompok kontrol negatif CMC 0,5%

Kelompok V : Kelompok kontrol positif furosemide 3,6 mg/kg BB.

9. Pengujian aktivitas diuretik

Sediaan furosemid diberikan pada hewan uji sekali dalam perlakuan dengan injeksi intra peritoneal (IP). Sediaan bahan uji CMC 0,5%, ekstrak etanol daun cincau hijau, dan loading dose diberikan sekali minum secara oral pada hewan uji. Urin yang keluar selama 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 24 jam ditampung dalam wadah. Volume urin yang diukur adalah volume urin pada tiap waktu pengamatan (Lumba, 2019).

Skema prosedur uji diuretik dapat dilihat pada gambar 2 (Lumba, 2019).



Gambar 3. Skema prosedur uji diuretik

Keterangan :

- Kel. 1 : Ekstrak etanol daun cincau hijau 60 mg/kg BB.
- Kel. 2 : Ekstrak etanol daun cincau hijau 120 mg/kg BB.
- Kel. 3 : Ekstrak etanol daun cincau hijau 240 mg/kg BB.
- Kel. 4 : Kelompok kontrol negatif CMC 0,5%
- Kel. 5 : Kelompok kontrol positif furosemide 3,6 mg/kg BB.

10. Pengukuran kadar menggunakan metode AAS.

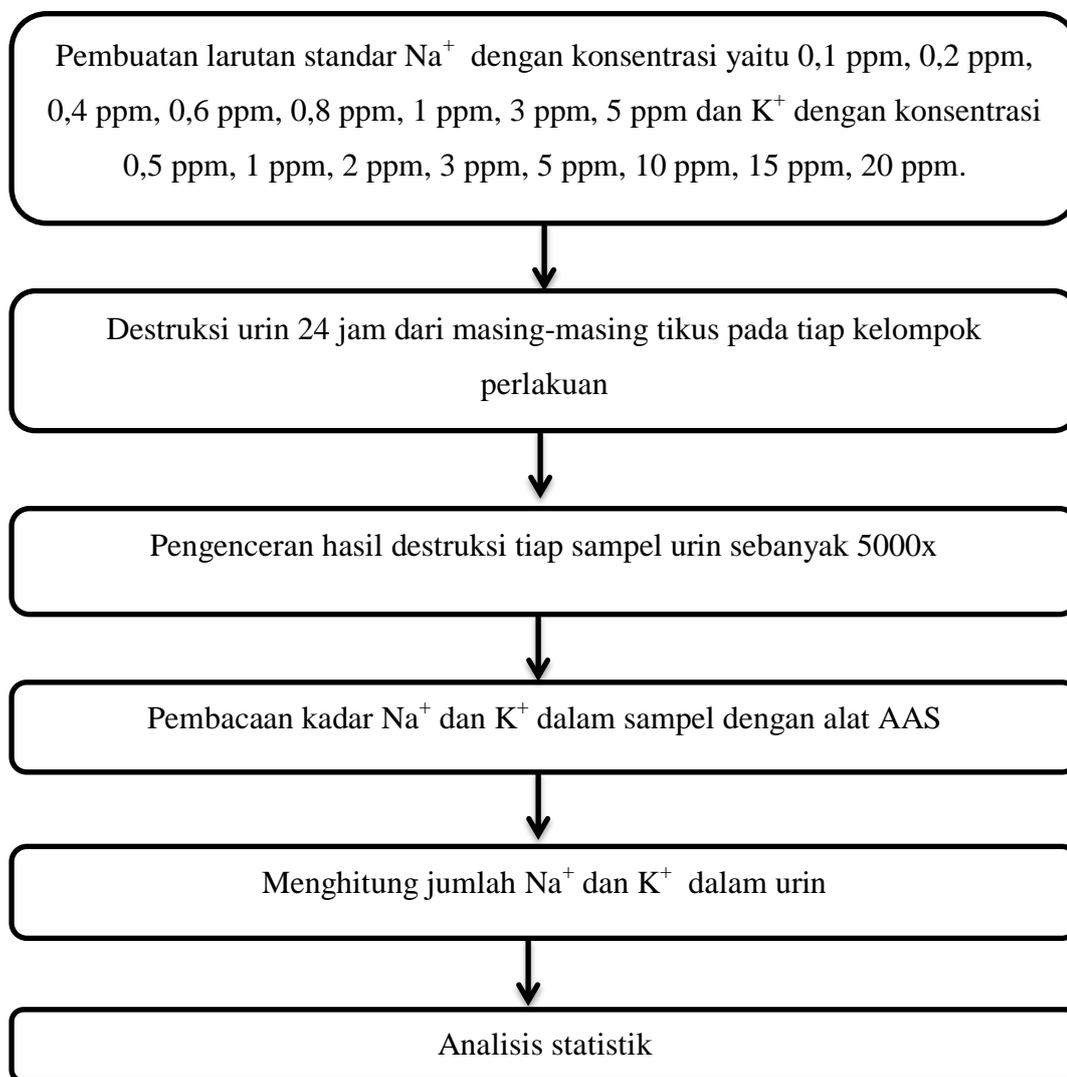
10.1 Pembuatan sampel. Sebanyak 1 ml urin dimasukkan ke dalam Erlenmeyer kemudian ditambahkan aquabidest sebanyak 50 ml. Sampel diukur kadar natrium menggunakan AAS pada panjang gelombang 589,0 nm dan kalium pada panjang gelombang 766,5 nm.

10.2 Pembuatan larutan standar Na⁺. Larutan standar natrium yang digunakan sebagai kurva kalibrasi dibuat dengan menggunakan larutan stok natrium 1000 ppm. Dari konsentrasi 1000 ppm kemudian dibuat larutan stok dengan konsentrasi 100 ppm. Konsentrasi yang dibuat sebagai standar pembacaan pada AAS yaitu 0,1 ppm, 0,2 ppm, 0,4 ppm, 0,6 ppm, 0,8 ppm, 1 ppm, 3ppm, 5 ppm.

10.3 Pembuatan larutan standar K⁺. Larutan standar kalium yang digunakan sebagai kurva kalibrasi dibuat dengan menggunakan larutan stok kalium 1000 ppm. Dari konsentrasi 1000 ppm kemudian dibuat larutan stok 100 ppm. Konsentrasi yang dibuat sebagai standar pembacaan pada AAS yaitu 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm.

10.3 Proses destruksi basah. Sampel urin 1 ml dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 50 ml larutan aqua bidestilata dan 5 ml HNO₃ 8M, selanjutnya dipanaskan sampai tersisa kurang lebih ½ dari volume semula menggunakan kompor listrik pada suhu 40°C kemudian didinginkan. Kadar Na⁺ dan K⁺ dalam sampel kemudian diukur dengan menggunakan panjang gelombang 589,0 nm untuk Na⁺, sedangkan kadar K⁺ dalam sampel diukur dengan menggunakan panjang gelombang yaitu 766,5 nm secara AAS.

Skema prosedur pengukuran Na^+ dan K^+ dalam urin dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 4. Skema prosedur pengukuran kadar Na^+ dan K^+ dalam urin

Perhitungan jumlah Na^+ dan K^+ dalam urin dilakukan dengan rumus :

Jumlah Na^+ dalam urin = volume urin x kadar Na^+ (ppm)

Jumlah K^+ dalam urin = volume urin x kadar K^+ (ppm)

E. Analisis Hasil

Data yang diambil pada uji aktivitas diuretik adalah volume urin dan jumlah Na^+ dan K^+ dalam urin. Volume urin adalah urin yang diambil pada jam ke 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 24. Jumlah Na^+ dan K^+ dalam urin adalah kadar Na^+ dan K^+ yang didapat dari hasil AAS dikalikan dengan jumlah urin 24 jam masing-masing hewan uji pada semua kelompok perlakuan.

Data yang diperoleh terlebih dahulu diuji distribusi dan homogenitas variannya menggunakan uji *Kolmogorov-smirnov*. Jika data terdistribusi normal selanjutnya diolah secara statistik dengan *One Way Anova*. Bila hasil analisis menunjukkan perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan dengan uji Post Hoc *Tukey*.