

## **BAB III METODE PENELITIAN**

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

Objek yang digunakan dalam penelitian ini disebut populasi. Tanaman alpukat (*Persea americana* Mill) adalah populasi dalam penelitian ini yang diambil di daerah Tawangmangu, Karanganyar Jawa Tengah dan diekskresikan di Laboratorium Universitas Setia Budi di Surakarta.

Unit dari populasi yang diteliti disebut sampel, yang mana keberadaan dan cirinya bisa mewakili keadaan populasi sesungguhnya. Sampel dalam penelitian ini adalah bagian daun dari alpukat yang diambil di daerah Tawangmangu, Karanganyar Jawa Tengah.

### **B. Variabel Penelitian**

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

Variabel yang terdiri dari variabel variabel bebas, terkontrol, dan tergantung disebut variabel utama. Tanaman alpukat (*Persea americana* Mill), dosis ekstrak daun alpukat, efektifitas diuretik untuk daun alpukat dan mencit putih adalah variabel utama dalam penelitian ini.

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

**2.1 Variabel utama.** Berisi identitas semua variabel yang diindeks secara langsung. Variabel yang telah dipelajari sebelumnya dapat dikategorikan ke dalam gaya variabel yang beragam, khususnya variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

**2.2 Variabel bebas.** Penelitian ini, variabel-variabel yang ingin diteliti berpengaruh pada variabel terstruktur. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill), dengan dosis yang beragam.

**2.3 Variabel tergantung.** variabel terstruktur adalah variabel yang unsur-unsurnya ditemukan dan diukur untuk menentukan dampak sebagai hasil dari variabel bebas dimana variabel tergantung dari penelitian adalah persen potensi diuretik pada mencit dan volume urin uji *Lipschitz*.

**2.4 Variabel terkontrol.** Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel bergantung agar ingin dinetralisir atau dikategorikan agar konsekuensi yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulangi melalui cara-cara peneliti yang berbeda secara tepat.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun alpukat (*Persea americana* Mill) yang diperoleh di balai besar pengembangan tanaman obat dan obat tradisional Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, daun alpukat yang diambil dalam keadaan bersih, kering dan tidak busuk, kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan debu yang masih menempel, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C, dihaluskan hingga menjadi serbuk dan diayak halus dengan saringan atau ayakan no 40.

Ketiga, ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) merupakan hasil akhir dari ekstraksi daun alpukat (*Persea americana* Mill) melalui cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% yang kemudian dipusatkan di dalam evaporator pada suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill).

Kelima, induksi yang digunakan adalah furosemide tablet diuretik *loop* yang diperoleh dari apotek 24 diberikan secara oral.

Keenam, uji *Lipschitz* adalah uji yang dilakukan oleh mencit untuk mengamati waktu yang dibutuhkan mencit untuk ekskresi urin dengan parameter persen potensi diuretik.

Ketujuh, persen potensi diuretik adalah tingkat yang menunjukkan adanya kualifikasi volume urin yang diproduksi.

Kedelapan, efek eksresi urin adalah efek dari ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) dengan melihat peningkatan pengeluaran urin terbanyak yang dibandingkan dengan kontrol positifnya.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada pengujian ini berupa botol kaca tertutup 2000 ml berwarna gelap, kain flanel, blender, ayakan nomor 40, Gelas ukur, Beaker glass, Erlenmeyer, kertas saring, gelas corong, oven, timbangan listrik AED-120 shimidzu. Alat atau unit yang digunakan dalam pengujian ini meliputi flame *photometri*, *disposable syringe*, kembang metabolisme, *moisture balance*, pisau stainless steel, pipet, sonde oral, dan tabung reaksi.

## **2. Bahan**

Bahan yang dipakai meliputi simplisia daun alpukat (*Persea americana* Mill), etanol 70%, karboksi metil selulosa natrium (CMC-Na), furosemid, aquadest, dan mencit putih (*Mus musculus*).

## **3. Hewan percobaan**

Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih (*Mus musculus*) yang dipuaskan 12-18 jam sebelum perlakuan. Pengelompokan dilakukan secara acak 25 ekor mencit putih (*Mus musculus*) yang dibagi menjadi 5 kelompok uji, kelompok kontrol positif, dan kontrol normal. Pemeliharaan mencit sebagai hewan berdasarkan atas usia rata-rata mencit, agar memperoleh morfologi organ yang sempurna sehingga obat terdistribusi baik.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Tempat penelitian**

Penelitian tugas akhir tersebut dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Fitokimia Universitas Setia Budi di Surakarta.

#### **2. Pengambilan bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun alpukat (*Persea americana* Mill) yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Daun alpukat yang dipilih yaitu memiliki kualitas yang paling baik misalnya terhindar dari hama, dan bebas dari bahan kimia.

#### **3. Determinasi tanaman**

Langkah pertama pada penelitian ini adalah determinasi daun alpukat (*Persea americana* Mill). Determinasi dilakukan dengan tujuan penetapan validasi sampel daun alpukat (*Persea americana* Mill) yang akan digunakan pada penelitian ini. Determinasi ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Dan Obat Tradisional Tawangmangu.

#### **4. Pembuatan serbuk daun alpukat (*Persea americana* Mill)**

Daun alpukat (*Persea americana* Mill) dikumpulkan, dipisahkan daunnya dari batangnya, dicuci bersih dengan air mengalir, ditiriskan di atas kertas perkamen, kemudian ditimbang dan berat basahanya menjadi diterima, kemudian daun alpukat dikeringkan di lemari pengering pada suhu 30-40°C sampai kering setelah itu ditimbang kering. Proses pengeringan bertujuan untuk mengurangi kandungan air agar tidak mudah ditumbuhi oleh jamur atau bakteri, menunda efektivitas enzim yang dapat mengurangi zat aktif dan memudahkan proses penggilingan

dan garasi. Menurut Farmakope Herbal Indonesia, pembuatan simplisia dengan cara diserbuk dengan blender dan diayak dengan ayakan 40 hingga semua serbuk terayak. Hasil saringan serbuk disimpan dalam kotak kedap air dan kedap air.

#### **5. Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill)**

Penetapan susut pengeringan dengan metode susut pengeringan menurut Farmakope Herbal Indonesia, menimbang kurang lebih 2 g sampel dimasukkan dalam *moisture balance* pada suhu 105°C ditunggu sampai pemanasan selesai hingga angkanya muncul dalam persen. Sampel dapat dikatakan telah memenuhi syarat dalam penetapan susut pengeringan jika kadar air dari serbuk/ekstrak daun alpukat tidak lebih dari 10%. (Setyawati, 2018).

#### **6. Identifikasi serbuk daun alpukat (*Persea americana* Mill)**

**6.1 Pemeriksaan organoleptis.** Pemeriksaan organoleptis adalah pemeriksaan fisik yang berupa penilaian visual tanpa menggunakan alat bantu. Pemeriksaan organoleptik yaitu terdapat pemeriksaan bentuk, bau, rasa, dan warna, pada bahan yang diukur dari 25 gram dibuka tutupnya selama 15 menit sebelum diamati. sedangkan pada bahan yang lebih dari 25 gram, berkisaran 25 gram bahan dipindahkan dalam cawan penguap 100 ml. Identifikasi bau hanya bersifat deskriptif dan tidak dapat menjadi standar kemurniaan dari bahan tersebut (Kemenkes, 2017).

**6.2 Penetapan kadar air.** Penetapan kadar air pada serbuk etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill) dilakukan dengan cara destilasi menggunakan alat *Bidwell Sterling Moisture Trop Vapor*. Caranya dengan menimbang serbuk daun alpukat sebanyak 5 gram dimasukkan dalam labu alas bulat *Bidwell Sterling* ditambahkan dengan toluen 20ml lalu dipanaskan selama 15 menit, saat toluen mendidih destilasi diatur menjadi 2 tetes per detik sehingga lebih banyak air yang tersuling. Tingkatkan Kembali kecepatan menjadi 4 tetes per detik. Membersihkan bagian pendingin dan tabung yang terhubung dengan kawat menggunakan sikat dan toluen jenuh air saat semua air tersuling. Destilasi dilakukan selama 5 menit. Tabung penerima didinginkan sampai suhu kamar, apabila masih terdapat tetesan yang menempel maka dilakukan penggosokan pada tabung pendingin, rekatkan tabung penerima dengan kawat tembangga, setelah itu basahi dengan toluen jenuh air sampai tetesan air yang menempel tersebut jenuh. Volume air

setelah air dan toluen terpisah secara sempurna dapat dihitung kadar airnya dalam satuan % v/b menggunakan rumus (Kemenkes, 2017) :

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

### **7. Pembuatan ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill)**

Daun alpukat diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% perbandingan pada serbuk dan etanol yaitu 1:10 dengan cara menimbang 500 gram serbuk daun alpukat dan direndam dengan 5L etanol 70% dalam botol bejana selama 2 hari sesekali digojok dalam waktu 6 jam, 18 jam, setelah 2 hari ekstrak disaring dengan kertas saring dan kail flannel. Sisa ampas dari penyaringan tersebut dimasukkan kembali dalam botol bejana lalu di beri 2,5L pelarut etanol 70% lalu direndam kembali selama 1 hari, setelah 1 hari ekstrak disaring kembali lalu ekstrak cairnya di tampung pada suhu 50° C dengan kecepatan 45 rpm dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak etanol daun alpukat yang kental (Kemenkes RI, 2017) dan diuapkan diatas *waterbath* sampai diperoleh ekstrak kental yang siap ditimbang bobotnya dengan cara hasil penimbangan ekstrak kental dibagi hasil penimbangan serbuk daun alpukat dan dikali 100%.

### **8. Identifikasi kandungan ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill)**

**8.1 Uji alkaloid.** Sampel ditimbang terlebih dahulu sebanyak 2 gram ditambahkan HCL 2 N masukkan kedalam tabung reaksi. ditambahkan dengan 3 tetes pereaksi *mayer* hingga terbentuk endapan kuning/putih. Tambahkan 3 tetes dengan reagen *Bouchardat* untuk mendapatkan endapan coklat sampai hitam. Tambahkan 3 tetes pereaksi *Dragendrof* dan terbentuk endapan jingga sampai coklat kemerahan. Jika dua dari 3 reagen mendapatkan hasil endapan yang sama maka positif mengandung alkaloid (Sentat T, 2015).

**8.2 Uji flavonoid.** Ambil 10 tetes ekstrak daun alpukat dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan 2 tetes HCl pekat, serbuk Mg, dan 2 tetes amil alkohol, Bila terdapat bentuk warna kuning, jingga, atau merah pada lapisan amil alkohol maka memberikan indikasi adanya flavonoid (Sentat T., Permatasari R. (2015).

**8.3 Uji saponin.** Ambil 10 tetes ekstrak daun alpukat masukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan air panas secukupnya, lalu dikocok selama 15 menit dan 2 tetes HCl 2 N bila terbentuk buih maka permanen selama kurang lebih 10 menit maka terdapat indikasi saponin (Sentat T., Permatasari R. (2015).

**8.4 Uji tannin.** Ambil 5 ml filtrat ekstrak daun alpukat masukkan kedalam tabung reaksi tambahkan dengan  $\text{FeCl}_2$  0,1% 3 tetes hingga berubah warna, apabila terdapt warna hijau kecoklatan atau warna biru hitam maka menunjukkan bahwa ekstrak positif mengandung tannin (Kumalasari and Andriana, 2020).

**8.5 Uji steroid dan terpenoid.** Ekstrak daun alpukat dilarutkan dengan etanol 70% lalu disaring. Filtrat yang dihasilkan diambil dan diuapkan dalam cawan. Residu yang didapatkan ditambah 2 tetes asam asetat anhidrat, kloroform 2 tetes dan tambahkan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat melalui dinding. Jika hasil terbentuk cincin biru kehijauan maka mengandung steroid, dan jika terbentuk warna ungu atau cincin kecoklatan maka positif mengandung terpenoid (Yuda, 2017).

**8.6 Uji KLT.** Skrining fitokimia dilakukan pada ekstrak kental daun alpukat. Proses skrining tersebut bertujuan untuk menganalisis kandungan senyawa metabolit sekunder terutama kuersetin yang termasuk golongan flavonoid yang terdapat pada ekstrak kental daun alpukat. Identifikasi tersebut dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan melarutkan hasil ekstraksi dengan methanol dan dilakukan penotolan pada plat menggunakan mikro pipet pada jarak 1 cm dari garis bawah. Uji kromatografi Lapis Tipis (KLT) flavonoid untuk kursetin menggunakan fase gerak Kloroform:methanol dengan masing-masing perbandingan 1:9 dan ditunggu sampai semua totalan terelusi. Kemudian diangkat dan dikeringkan untuk diamati yang terpisah dengan sinar tampak, menggunakan lampu UV 254 nm dan UV 366 nm setelah disemprot dengan  $\text{AlCl}_3$  10% (Elisa, 2021).

## **9. Pembuatan dan pemberian sediaan uji**

**9.1 Larutan CMC-Na 0,5 %.** Tujuan digunakan CMC-Na adalah supaya zat aktif dapat terdipresi sempurna dserta homogen sehingga bisa diberikan dengan dosis yang seragam. CMC-Na sebagai kontrol negative faktor stok ini dibuat dengan menimbang serbuk CMC-Na sebanyak 0,5 g lalu masukkan dalam mortir berisi 50 ml aqua destilata panas, digerus hingga mengembang dan menambah aqua destilata panas hingga 100 ml sedikit demi sedikit, aduk sampai homogen.

**9.2 Dosis furosemide.** Dosis lazim furosemide sekali pakai adalah 40 mg. Uji dilakukan pada mencit maka dari itu dosis dikonversikan dari manusia ke mencit dengan faktor konversi 0,0026

menjadi 0,104mg /kgBB mencit atau 5,2 mg/kbBB mencit. Prosedur pembuatan suspensi furosemide yaitu masukkan 1 tablet furosemide (40 mg) ke dalam mortir gerus hingga halus, kemudian ditambahkan suspensi CMC-Na 0,5% sedikit demi sedikit hingga homogen.

**9.3 Dosis ekstrak etanol daun alpukat.** Dosis pemberian ekstrak dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok 3, 4 dan 5. Masing-masing dengan dosis 70, 140, 210 mg/kg BB (erlinda, 2017). Penggunaan dosis 210 mg didasarkan pada 3 kali dosis efektif yaitu 70mg. Ekstrak kental dibuat suspensi dengan cara menambahkan CMC 0,5% dalam mortir kemudian ditambahkan aquadest digerus hingga terbentuk mucilago kemudian ditambahkan ekstrak kental diaduk hingga tercampur dan masukkan ke dalam botol yang telah dikalibrasi dengan ditambah aquadest sampai 100 ml.

## **10 Perlakuan ke hewan uji**

Vogel, 2002 menyatakan bahwa metode *Lipschitz* dengan modifikasi saluretik adalah metode uji diuretik yang digunakan. Parameter yang diambil yaitu onset terjadinya diuresis dengan pengukuran urin kumulatif serta kadar natrium dan kalium urin. Pada metode ini hewan percobaan hanya diberikan minuman tanpa makanan selama 15 jam. Dilakukan pengujian hewan uji sejumlah 25 ekor mencit putih (*Mus musculus*) dalam 5 kelompok. Satu kelompok kontrol negatif dengan diberi CMC-Na 0,5 %, satu kelompok sebagai pembanding dengan perlakuan diberi furosemide 0,104mg/kg BB mencit, dan tiga kelompok uji diberi ekstrak etanol daun alpukat dengan variasi dosis 70mg/kg BB mencit, 140mg/kg BB mencit, 210 mg/kg BB mencit dengan cara peroral. Semua mencit percobaan diberi larutan NaCl fisiologis 0,9% 4ml/ kg BB mencit. Kelompok masing-masing diberikan sediaan larutan uji yang sesuai setelah 30 menit. dilakukan pencatatan tiap sejam selama 6 jam dan 24 jam pada volume urin yang dieksresikan oleh mencit dalam kandang metabolisme (Vogel, 2002).

## **11 Pengukuran volume urin**

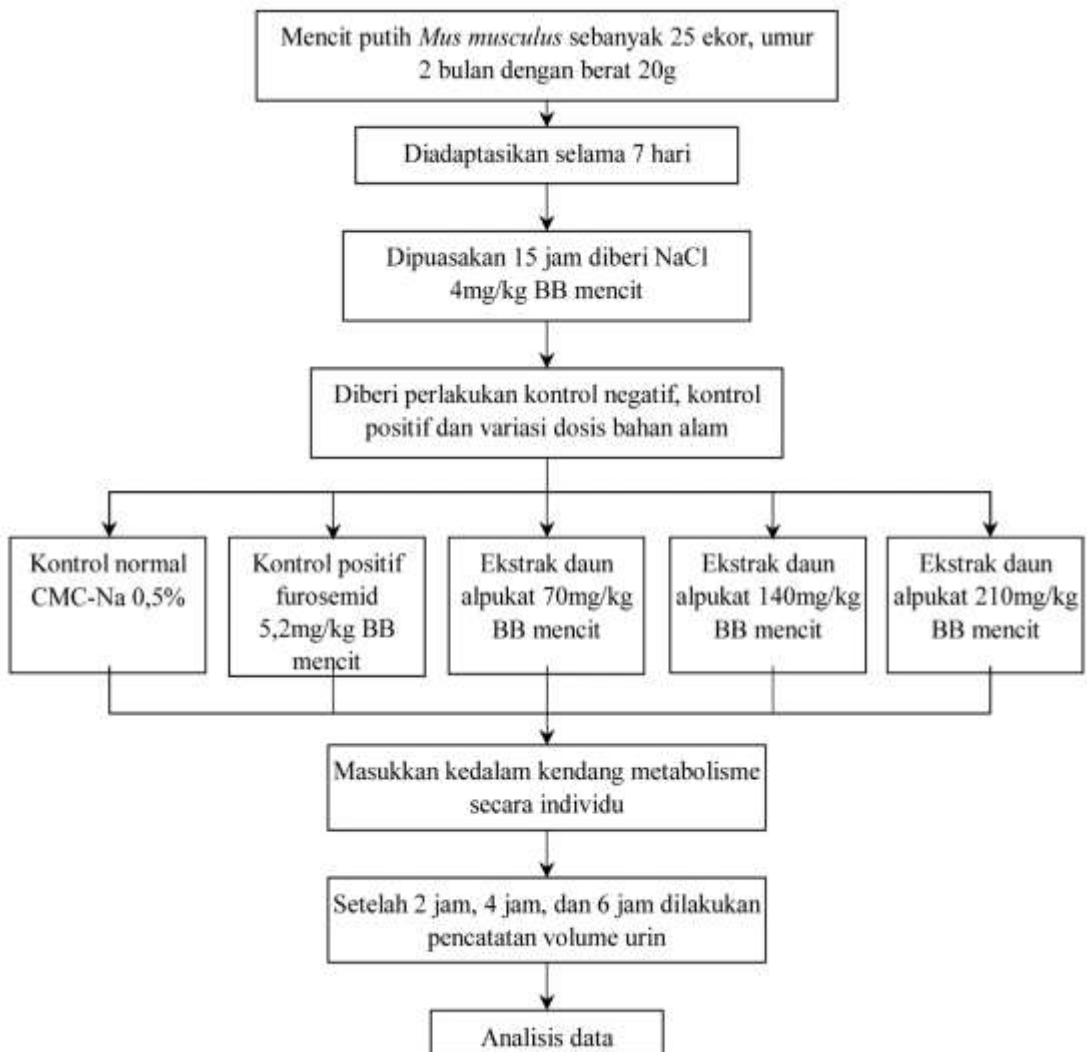
Volume urin mencit adalah banyaknya urin yang dieksresikan oleh mencit putih (*Mus Musculus*) setelah pemberian ekstrak daun alpukat yang ditampung dan diukur pada onset dimulainya efek diuretik dan tiap 1 jam sekali selama 6 jam perlakuan uji.

### E. Analisis Hasil

Teknik analisis data berdasarkan perolehan data urin dianalisis dengan uji Anova (*One-way analysis of variance*) dengan tujuan untuk mengetahui perbandingan rata-rata dua variabel atau lebih dengan tingkat kepercayaan 95% dengan menggunakan aplikasi SPPSS *for statistic*.

Dilakukan uji lanjutan dengan metode *Tukey* jika terdistribusi normal dan terdapat perbedaan bermakna namun jika tidak terdistribusi normal atau tidak memenuhi syarat menggunakan metode *Kruskal Wallis*.

### F. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur penelitian