

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah daun alpukat yang berasal dari tanaman alpukat yang ada di daerah Tawangmangu, provinsi Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun alpukat yang diambil secara acak dengan memilih daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna hijau dari pangkal daun sampai ujung daun, masih segar serta bebas dari penyakit dan hama.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian yang dilakukan ini adalah fraksi etil asetat daun alpukat (*Persea americana* Mill.) yang diperoleh dengan metode maserasi kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi dan diujikan terhadap tikus putih jantan.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam beberapa macam variabel antara lain: variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

2.1. Variabel Bebas. Variabel bebas yang terdapat pada penelitian ini merupakan variabel yang variasinya memengaruhi terhadap hasil dari variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi dosis fraksi etil asetat daun alpukat.

2.2. Variabel Tergantung. Variabel tergantung yang terdapat pada penelitian ini merupakan variabel yang ingin dilihat nilainya akibat pengaruh dari variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah efek diuretik fraksi etil asetat daun alpukat dengan melihat data volume urin.

2.3. Variabel Terkendali. Variabel terkendali yang terdapat pada penelitian ini merupakan variabel yang efeknya dikontrol supaya tidak memengaruhi variabel tergantung. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi sampel, waktu pengamatan, suasana laboratorium, alat, berat badan, usia dan jenis kelamin tikus.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama daun alpukat adalah daun yang diambil secara acak dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Dipilih daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna hijau dari pangkal daun sampai ujung daun, masih segar serta bebas dari penyakit dan hama.

Kedua, serbuk daun alpukat (*Persea americana* Mill.) adalah daun alpukat yang dikeringkan, kemudian diserbuk menjadi serbuk yang kemudian diayak menggunakan ayakan no. 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.) adalah ekstrak yang didapat dan diproses dengan metode maserasi menggunakan etanol 96 % sebagai cairan penyari.

Keempat, fraksi etil asetat adalah hasil fraksi dari ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat sebagai pelarut semipolar, sehingga diperoleh fraksi etil asetat.

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

Keenam, efek diuretik pada penelitian ini adalah efek yang terjadi setelah hewan uji diberikan air hangat sebagai loading dose pada setiap kelompok tikus 30 menit sebelum perlakuan uji, dilanjutkan dengan pemberian larutan uji dan dicatat waktu hewan mulai mengeluarkan urin.

Ketujuh, dosis efektif adalah dosis yang mampu memberikan efek diuretik dengan dosis terkecil.

C. Bahan, Alat dan Hewan Uji

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun alpukat (*Persea americana* Mill.) yang masih segar dan berwarna hijau berasal dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan yang telah dikondisikan selama satu minggu. Bahan lain yang juga digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%, air suling, etil asetat, furosemid, *n*- heksan dan CMC 0,5%.

2. Alat

Alat-alat gelas, mesin giling, ayakan nomor 40, corong pisah, oven, rotary evaporator, bejana maserasi, jarum oral, kandang metabolit, spuit dan timbangan digital.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) sebanyak 25 ekor yang diperoleh dari Universitas Setia Budi Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tahap pertama dalam melakukan penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman daun alpukat yang berkaitan dengan morfologi tanaman terhadap kepustakaan. Determinasi tanaman daun alpukat dilakukan di B2P2TOOT Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Pengambilan Daun Alpukat

Daun alpukat segar dikumpulkan dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Ekstraksi daun alpukat dilakukan dengan memetik batang segar dan dipatahkan di pangkal daun. Daun alpukat yang telah diambil ditimbang untuk mengetahui berat basahanya.

3. Pengeringan Daun Alpukat

Daun alpukat yang sebelumnya telah diambil kemudian dicuci bersih selanjutnya dilakukan pengeringan dengan menggunakan sinar matahari sampai diperoleh daun yang kering. Daun yang telah dikeringkan ditimbang sebagai berat kering yang selanjutnya dilakukan perhitungan persentase berat daun kering terhadap berat daun basah.

4. Pembuatan Serbuk Daun Alpukat

Daun alpukat yang telah dikeringkan selanjutnya diserbuk dengan menggunakan mesin penyerbuk di Universitas Setia Budi Surakarta. Serbuk kering kemudian diayak dengan menggunakan ayakan nomor 40 untuk memastikan keseragaman ukuran halus serbuk (Sentat dan Rizky, 2015). Hasil dari serbuk kering daun alpukat disimpan dalam plastik ukuran besar.

5. Penetapan Susut Pengeringan

Penetapan susut pengeringan ditentukan dengan menggunakan alat *Moisture balance* pada suhu 105°C. Serbuk daun alpukat yang digunakan sebanyak 2 gram, dimasukkan ke dalam alat dan ditunggu 4-

5 menit untuk melihat hasil setiap pengukuran. Hasil penetapan susut pengeringan yang baik yaitu tidak lebih dari 10% (Depkes RI, 2008).

6. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Alpukat

Ekstraksi simplisia daun alpukat dilakukan dengan metode maserasi dengan cara menimbang serbuk daun alpukat sebanyak 1200 g yang dimasukkan ke dalam bejana maserasi kemudian ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 12 L. Simplisia direndam selama 24 jam dan dilakukan pengadukan sesering mungkin. Hasil ekstrak cair disaring dengan menggunakan kertas saring kemudian ditampung dalam sebuah wadah kaca. Sisa ampasnya dilakukan remaserasi dengan menggunakan setengah pelarut awal. (Sentat dan Rizky, 2015).

7. Penetapan Kadar Air Ekstrak

Penetapan kadar air metode gravimetri dengan menggunakan 10 gram ekstrak ditimbang dalam wadah yang telah ditara. Dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam di dalam oven dan setelah itu ditimbang. Kadar air dihitung dalam persen terhadap berat awal (FHI, 2017).

8. Pembuatan Fraksi Etil Asetat Daun Alpukat

Ekstrak etanol dari daun alpukat yang didapat ditambah 75 ml air kemudian difraksinasi dengan n-heksana dilakukan sebanyak tiga kali masing-masing 75 ml menggunakan corong pisah. Sari n-heksana selanjutnya dikumpulkan kemudian dipekatkan menggunakan vakum evaporator, sari n-heksana yang sudah pekat disebut ekstrak fraksi n-heksana. Lapisan berair sisa partisi dengan n-heksana kemudian dipartisi lagi dengan 75 ml etil asetat sebanyak 3 kali. Lapisan etil asetat dipisahkan dan dipekatkan menggunakan vakum evaporator dan diperoleh ekstrak fraksi etil asetat.

9. Identifikasi Ekstrak dan Fraksi Daun Alpukat

9.1 Pemeriksaan Organoleptis. Identifikasi dilakukan secara organoleptis berdasarkan bentuk, warna dan bau dari ekstrak dan fraksi daun alpukat.

9.2 Identifikasi Kandungan Senyawa.

9.2.1 Flavonoid. Uji flavonoid yang dilakukan ditimbang sebanyak 1 gram ekstrak dan fraksi-fraksi daun alpukat, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes HCl pekat, serbuk Mg, dan 2 tetes amil alkohol, sehingga menghasilkan warna kuning, jingga, atau merah pada lapisan amil alkohol memberikan indikasi adanya flavonoid (Sentat dan Permatasari, 2017).

9.2.2 Saponin. Uji saponin yang pertama ditimbang sebanyak 1 gram ekstrak dan fraksi-fraksi daun alpukat, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan air panas secukupnya, kemudian dikocok selama 15 menit dan ditambahkan 2 tetes HCl 2 N, Bila terbentuk buih permanen selama kurang lebih 10 menit maka memberikan indikasi adanya saponin (Sentat dan Permatasari, 2017).

9.2.3 Tanin. Uji tanin ditimbang sebanyak 1 gram ekstrak dan fraksi-fraksi daun alpukat, kemudian ditambah 10 ml air suling selanjutnya disaring, filtrat diencerkan dengan air suling sampai tidak berwarna, kemudian diambil 2 ml filtrat dan ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi FeCl₃, bila terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman memberikan indikasi adanya tanin (Sentat dan Permatasari, 2017).

9.2.4 Alkaloid. Uji alkaloid yang dilakukan pertama ditimbang sebanyak 1 gram ekstrak dan fraksi-fraksi daun alpukat, sebanyak 1 ml HCl 2 N dan 9 ml aquadest, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit setelah itu didinginkan dan disaring, diambil filtrat beberapa tetes dimasukan ke dalam 3 tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer dan terbentuk endapan putih/kuning, ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat hingga terbentuk endapan coklat sampai hitam, ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendrof hingga terbentuk endapan jingga sampai merah coklat. Bila sedikitnya 2 dari 3 pereaksi menghasilkan endapan yang sama maka positif mengandung alkaloid (Sentat dan Permatasari, 2017).

10. Pengujian KLT Ekstrak dan Fraksi Daun Alpukat

10.1 Ekstrak Daun alpukat. Pembuatan fase gerak kloroform : metanol (1:9) dan penjenuhan, larutan baku kuersetin dan ekstrak kental daun alpukat ditotolkan pada lempeng KLT kemudian spot di bawah lampu UV 254 nm. Lempeng KLT dielusi hingga diberi batas elusi, diamati spot yang terpisah dengan sinar tampak, UV 254 nm, dan penampak bercak uap moniak 25%.

10.2 Fraksi Air. Pembuatan fase gerak kloroform : metanol (1:10) dan penjenuhan, baku kuersetin dan sampel fraksi air daun alpukat ditotolkan pada lempeng KLT, Dilihat spot dibawah lampu UV 254 nm, Lempeng KLT dielusi hingga batas elusi, Diamati spot yang terpisah dengan sinar tampak, UV 254 nm, dan diberi penampak bercak uap moniak 25%.

10.3 Fraksi n-heksan dan Etil Asetat. Pembuatan fase gerak kloroform : metanol (4:6) dan penjenuhan, kemudian baku kuersetin

dan etil asetat dan n-heksan daun alpukat ditotolkan pada lempeng KLT, dilihat pada bagian spot dibawah lampu UV 254 nm, lempeng KLT dielusi hingga batas elusi dan amati spot yang terpisah dengan sinar tampak, UV 254 nm, dan diberi penampak bercak uap moniak 25%.

11. Pembuatan Larutan Stok

11.1 Pembuatan Larutan CMC 0,5 %. Dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram lalu dimasukkan aquadest panas secukupnya ke dalam mortar dan ditaburkan Na CMC 0,5 gram ditunggu 10 menit hingga mengembang kemudian gerus sampai mengembang dan ditambahkan sedikit demi sedikit aquadest sampai volume 100 ml lalu aduk sampai homogen. Larutan ini akan digunakan sebagai kontrol negatif dan pensuspensi kontrol positif dan fraksi etil asetat daun alpukat.

11.2 Pembuatan Suspensi Furosemide. Dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram lalu dimasukkan aquadest panas secukupnya ke dalam mortar dan ditaburkan Na CMC 0,5 gram ditunggu 10 menit hingga mengembang kemudian gerus sampai mengembang dan ditambahkan 40 mg furosemide yang sudah digerus kemudian aduk sampai homogen lalu ditambahkan aquadest sampai 100 ml aduk sampai homogen.

11.3 Pembuatan Suspensi Fraksi Etil Asetat Daun Alpukat. Dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram lalu dimasukkan aquadest panas secukupnya ke dalam mortar dan ditaburkan Na CMC 0,5 gram ditunggu 10 menit hingga mengembang kemudian gerus sampai mengembang dan ditambahkan fraksi etil asetat daun alpukat lalu aduk sampai homogen homogen lalu ditambahkan aquadest sampai 100 ml aduk sampai homogen.

12. Pengelompokkan Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih jantan sebagai hewan uji yang sudah diadaptasi selama 7 hari. Hewan uji dikelompokkan ke dalam 5 kelompok sehingga masing – masing kelompok terdapat 5 ekor tikus putih jantan.

Kelompok pertama adalah kelompok kontrol positif. Kelompok ini diberi suspensi furosemide 3,6 mg/kg BB.

Kelompok kedua adalah kelompok kontrol negatif. Kelompok ini diberi suspensi Na CMC 0,5%

Kelompok ketiga adalah kelompok pemberian fraksi etil asetat daun alpukat dosis 75 mg/kg BB terhadap tikus putih jantan

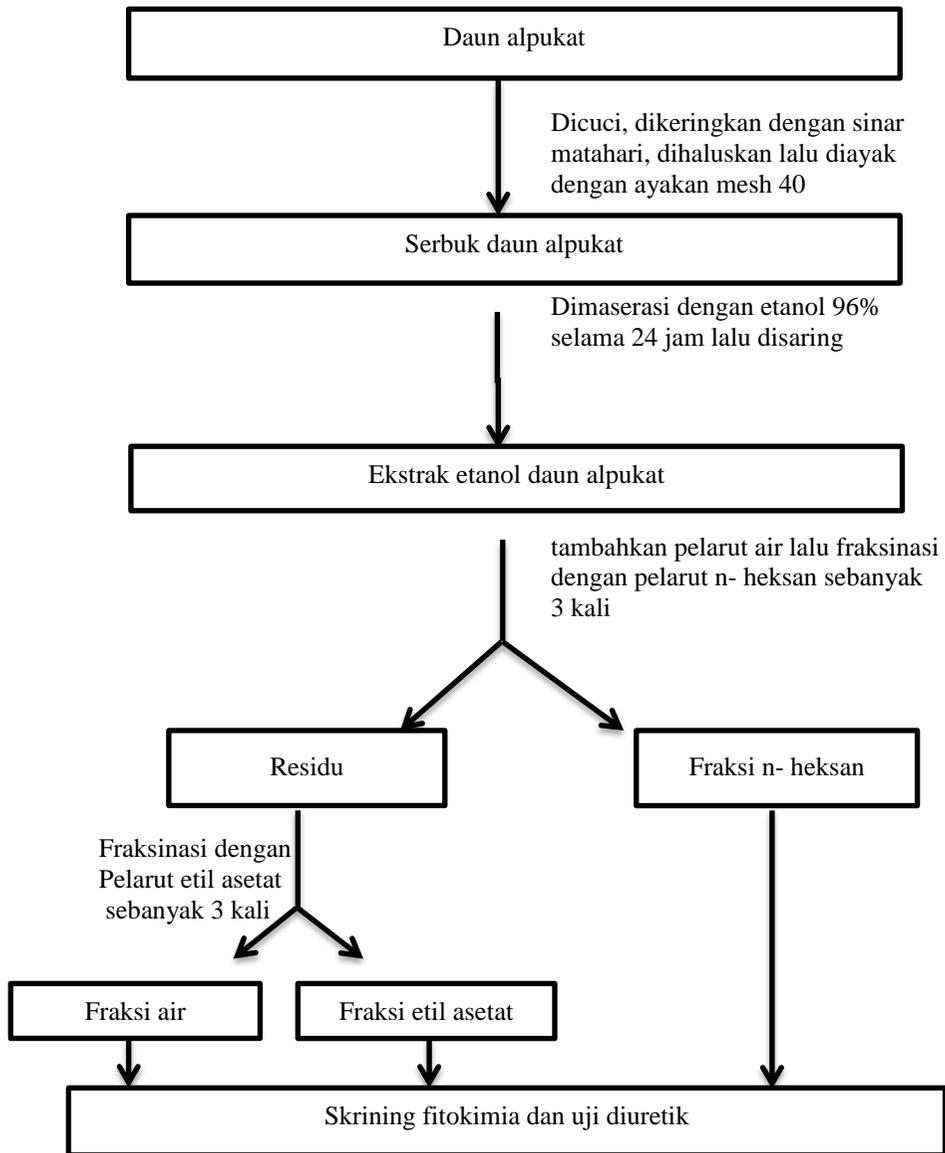
Kelompok keempat adalah kelompok pemberian fraksi etil asetat daun alpukat dosis 150 mg/kg BB terhadap tikus putih jantan

Kelompok kelima adalah kelompok pemberian fraksi etil asetat daun alpukat dosis 300 mg/kg BB terhadap tikus putih jantan

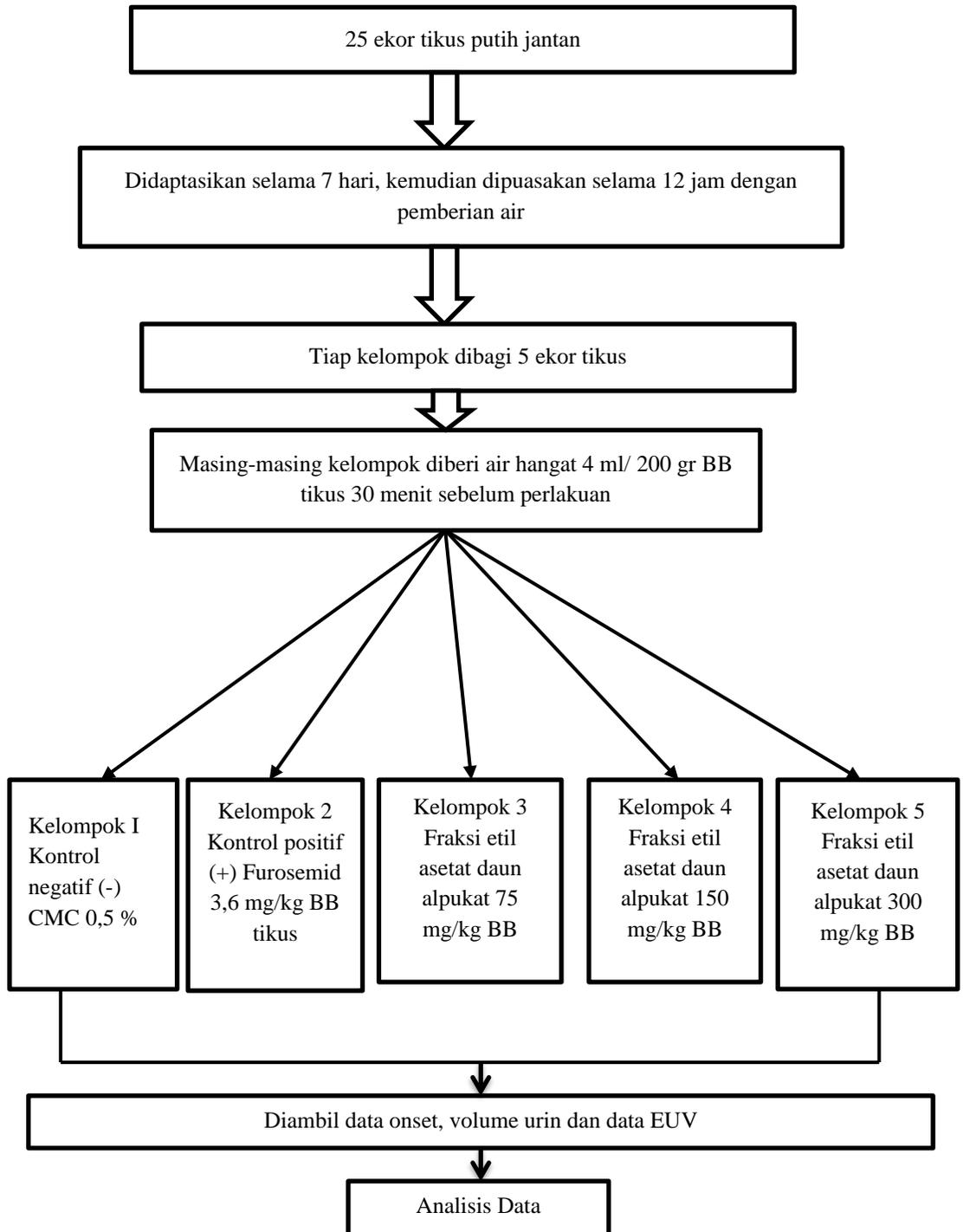
13. Pengujian Aktivitas Diuretik

Metode uji diuretik yang digunakan adalah metode *Lipschitz* 1943 dengan modifikasi (Afifah *et al.*, 2013). Pada metode ini sebanyak 25 ekor tikus putih jantan 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 tikus, kelompok ketiga adalah fraksi etil asetat daun alpukat 75 mg/kg BB, kelompok empat adalah fraksi etil asetat daun alpukat 150 mg/kg BB dan kelompok lima fraksi etil asetat daun alpukat 300 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 air hangat sebanyak 4 ml/200 gr 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 pada jam ke 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 24 (Vogel, 1990).

E. Skema Penelitian



Gambar 4. Pembuatan fraksi etil asetat daun alpukat



Gambar 5. Skema penelitian

F. Analisis Data

Data yang diambil pada uji aktivitas diuretik adalah data onset, volume urin, dan EUV (Ekskresi Urin Volumetrik). 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 Shapiro Wilk. Bila data terdistribusi normal, maka dilakukan uji One Way ANOVA. Bila hasil analisis menunjukkan perbedaan makna, maka dilanjutkan dengan uji post hoc Tukey.