

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan adalah daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) yang didapatkan di daerah Jember, Jawa Timur. Sampel yang digunakan adalah daun kacapiring yang diambil secara acak dengan memilih daun kacapiring hijau yang masih segar.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) yang diperoleh dengan metode maserasi dengan etanol 96%

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah uji efek diuretik dari ekstrak etanol daun kacapiring

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah semua variabel yang diteliti secara langsung. Variabel utama yang diidentifikasi dapat diklasifikasikan menjadi variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel terikat.

Variabel bebas yaitu variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kacapiring yang diujikan pada hewan uji mencit

Variabel terkontrol yaitu variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu ditetapkan kualitasnya. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah Kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, lingkungan hidup dan kondisi laboratorium dan praktikan.

Variabel terikat yaitu titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah efek diuretik mencit setelah diberi ekstrak etanol 96% daun kacapiring

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Batasan-batasan operasional variabel utama yang sesuai dengan permasalahan dalam penelitian ini adalah:

Pertama, Daun kacapiring adalah daun kacapiring yang dibeli dari Kabupaten Jember, Jawa Timur

Kedua, ekstrak etanol 96% daun kacapiring (*Gardenia augusta* Merr.) adalah ekstrak yang diperoleh dengan metode maserasi yang menggunakan pelarut etanol 96% kemudian diuapkan dengan alat rotary evaporator pada suhu 60°C yang bertujuan untuk menguapkan pelarutnya hingga berupa endapan yang tidak terlalu kental dan dipekatan dengan menggunakan oven atau waterbath pada suhu 40-50°C sampai menjadi ekstrak kental.

Ketiga, hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) yang mempunyai keseragaman berat badan 20-30 gram dan berumur 2-3 bulan.

Keempat, kontrol pembanding adalah sediaan tablet furosemid 40 mg yang diproduksi oleh PT Yarindo Farmatama.

Kelima, diuretik adalah peningkatan volume urin yang dikeluarkan mencit putih jantan

Keenam, efek diuretik adalah efek peningkatan volume urine yang dilihat dari parameter, yaitu onset, persen daya diuretik, dan persen EUV

Ketujuh, dosis efektif adalah dosis terkecil kelompok perlakuan yang dinyatakan berbeda makna terhadap kontrol negatif dan sebanding dengan kontrol positif dilihat dari parameter, yaitu onset, persen daya diuretik, dan persen EUV

C. Bahan dan Alat

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu corong pisah, blender, ayakan mesh no 40, botol kaca berwarna gelap, kain flannel, vakum evaporator, kaca arloji, beaker glass, oven, gelas ukur, erlenmeyer, batang pengaduk, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kertas saring, timbangan analitik, waterbath, injeksi oral 1 mL, moisture balance, timbangan mencit, kandang mencit, tempat minum mencit, dan stopwatch.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kacapiring, etanol 96%, aquadest, CMC, furosemid, dan air panas. Etanol 96 % diperoleh dari toko bahan kimia yang beredar di daerah Surakarta. Bahan obat furosemid sebagai kontrol positif yang diperoleh dari apotek

3. Hewan uji

Binatang atau hewan percobaan dalam praktikum ini adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) sehat yang berumur 7-8 minggu dengan berat badan 20-30 gram yang di peroleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan bahan atau sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah herba daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) yang diperoleh dari daerah Jember, Jawa Timur .

2. Determinasi tanaman kacapiring

Menetapkan kebenaran sampel yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman daun kacapiring terhadap pustaka yang dibuktikan dengan identifikasi yang dilakukan.

3. Pengumpulan dan pengeringan daun kacapiring

Daun kacapiring yang akan dikeringkan dicuci bersih dengan air mengalir atau bak bertingkat dan ditiriskan, hal ini bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang melekat pada daun kacapiring. Setelah itu, dipotong-potong kemudian dikeringkan dengan cara di oven pada suhu 55°C sampai kering dengan tujuan untuk mengurangi kadar air sehingga mencegah terjadinya pembusukan oleh mikroorganisme yaitu bakteri. Pembuatan serbuk daun kacapiring dilakukan dengan cara dihaluskan dengan mesin penggiling menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan no.40, kemudian dilakukan penetapan kadar air dari serbuk daun kacapiring. Tujuan pembuatan serbuk ini agar luas permukaan partikel bahan yang kontak dengan larutan penyaring dapat diperluas sehingga penyarian lebih efektif

4. Penetapan Kadar Kelembaban

Penetapan kadar kelembaban serbuk daun kacapiring dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Caranya dengan menimbang serbuk daun kacapiring sebanyak 2 gram ke dalam alat *moisture balance* ada suhu 105°C dan tunggu sampai alat memberikan tanda bunyi. Angka yang tertera pada alat *moisture balance* adalah persen kadar air yang dihasilkan oleh serbuk daun kacapiring selama proses pemanasan.

5. Pembuatan Ekstrak Daun Kacapiring

Simplisia daun kacapiring ditimbang dan diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Perendaman dilakukan berulang kali dengan maserasi dan remaserasi. Ekstrak yang didapat dikentalkan dengan menggunakan rotary evaporator dan water bath pada suhu yang dijaga $\pm 50^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh ekstrak kental etanol daun kacapiring. Ekstrak kental yang didapat kemudian dihitung nilai rendemen. Rendemen dihitung dengan jumlah ekstrak yang didapat dibagi dengan jumlah simplisia dikali 100%.

6. Identifikasi Kandungan Kimia

6.1 Identifikasi Flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan sampel ekstrak daun kacapiring dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 0,1 g kemudian ditambahkan 10 mL aquadest dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan serbuk Mg, 1 mL HCl pekat dan 1 mL amilalkohol kemudian dikocok dengan kuat. Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol (Nugrahani 2016)

6.2 Identifikasi Terpenoid dan Steroid. Identifikasi Terpenoid dan Steroid dilakukan dengan cara sebanyak 0,1 g sampel serbuk dan ekstrak dilarutkan dengan metanol kemudian diuapkan diatas waterbath. Filtrat digerus kemudian dilarutkan dengan 2 ml kloroform dalam tabung reaksi, lalu ditambah dengan asam asetat anhidrat sebanyak 10 tetes, selanjutnya larutan ditetesi dengan H_2SO_4 pekat 3 tetes melalui dinding tabung reaksi. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelaut menunjukkan adanya triterpene, sedangkan munculnya warna hijau menunjukkan adanya steroid (Nugrahani 2016).

6.3 Identifikasi Saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan cara sebanyak 0,1 g sampel serbuk dan ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL air panas dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi tertutup kemudian dikocok selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit, ditambahkan 1 mL HCl 2M. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil (Nugrahani, 2016)

6.4 Identifikasi Tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan cara Sebanyak 0,1 g sampel serbuk dan ekstrak ditambah dengan 10 mL air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring. Sebagian filtrate yang diperoleh ditambahkan dengan larutan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna hijau kehitaman (Nugrahani 2016).

7. Penetapan Dosis

7.1 Dosis Furosemid. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah furosemide dengan dosis 40 mg/70kg BB. Konversi dosis manusia ke mencit menjadi 0,0,104 mg/20gr BB. Dengan volume pemberian dari larutan stok 0,04% yaitu 0,35 mL/20 g BB.

7.2 Dosis Larutan CMC. Menimbang 0,5 gram CMC kemudian ditambah dengan aquadest hangat ad 100 mL dan aduk sampai homogen. Pemberian Kepada hewan uji sebanyak

7.3 Dosis Ekstrak Daun Kacapiring. Dosis ekstrak daun kacapiring yang digunakan dalam penelitian yaitu konversi dosis tikus ke mencit 17,5 mg/kgBB, 35mg/kgBB, dan 70mg/kgBB

8. Pengujian Efek Diuretik

Uji efek diuretik dilakukan terhadap 5 kelompok tikus. Kemudian secara langsung diberikan sediaan pada masing-masing kelompok. Setelah itu untuk kelompok kontrol diberi suspensi CMC 0,5%. Kelompok pembanding diberi suspensi furosemide 0,104 mg/20gr BB secara peroral. Kelompok uji 1 diberi suspensi ekstrak etanol daun kacapiring dosis 0,35 mg/20gr BB, kelompok uji 2 diberi suspensi ekstrak etanol daun kacapiring dosis 0,7 mg/20gr BB dan kelompok uji 3 diberi suspensi ekstrak etanol daun kacapiring dosis 1,4 mg/20gr BB.

Uji efek diuretik dilakukan dengan mengukur volume urin kumulatif pada seluruh kelompok yaitu kelompok kontrol pembanding, uji 1 dosis 0,35 mg/20gr BB , uji 2 dosis 0,7 mg/20gr BB, dan uji 3 dosis 1,4 mg/20gr BB. Prosedur pengujian efek diuretik daun kacapiring terhadap mencit putih jantan:

Pertama, semua mencit dikelompokkan secara acak sesuai dengan kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor tikus yang dipuaskan terlebih dahulu selama 18 jam sebelum pemberian perlakuan semua kelompok diberi aquadest hangat sebanyak 0,56 mL/20 gr BB, lalu di tunggu selama 15 menit.

Kedua, masing-masing mencit putih jantan diberi tanda sesuai dengan kelompok masing-masing. Kelompok pertama (kontrol negatif) dengan pemberian suspensi CMC, kelompok kedua (kontrol positif) dengan pemberian suspensi furosemide. Kelompok ketiga sebagai kelompok bahan uji yaitu kelompok bahan uji ekstrak etanol daun kacapiring yang dibagi dalam tiga kelompok dosis.

Ketiga, sebelum diberi obat semua mencit ditimbang, kemudian dilakukan pemberian sediaan sesuai dengan kelompok perlakuan. Pada saat pemberian obat atau pada waktu ke-0 dari kelompok kontrol positif (furosemide), kelompok kontrol negatif (suspensi CMC 0,5%). Kelompok 3 dosis I, kelompok 4 dosis II dan kelompok 5 dosis III, lalu mencit ditempatkan di dalam kandang metabolit

Keempat, selesai perlakuan diamati dan dicatat mula kerja (onset), yaitu waktu dari permulaan diberinya bahan uji sampai tikus mengeluarkan urin dalam satuan menit dan volume urin yang keluar pengamatan dilakukan setiap 1 jam selama 6 jam dan jam ke-24.

Parameter uji diuretik yaitu onset, ekskresi urin volumetrik, dan daya diuretik. Perhitungan persentase potensi diuretik menggunakan rumus:

$$\% \text{ Daya Diuretik} = \frac{\text{AUC tiap perlakuan} - \text{AUC kontrol negatif CMC 0.5\%}}{\text{AUC kontrol negatif CMC 0.5\%}} \times 100\%$$

Sedangkan perhitungan presentase ekskresi urin volumetrik menggunakan rumus:

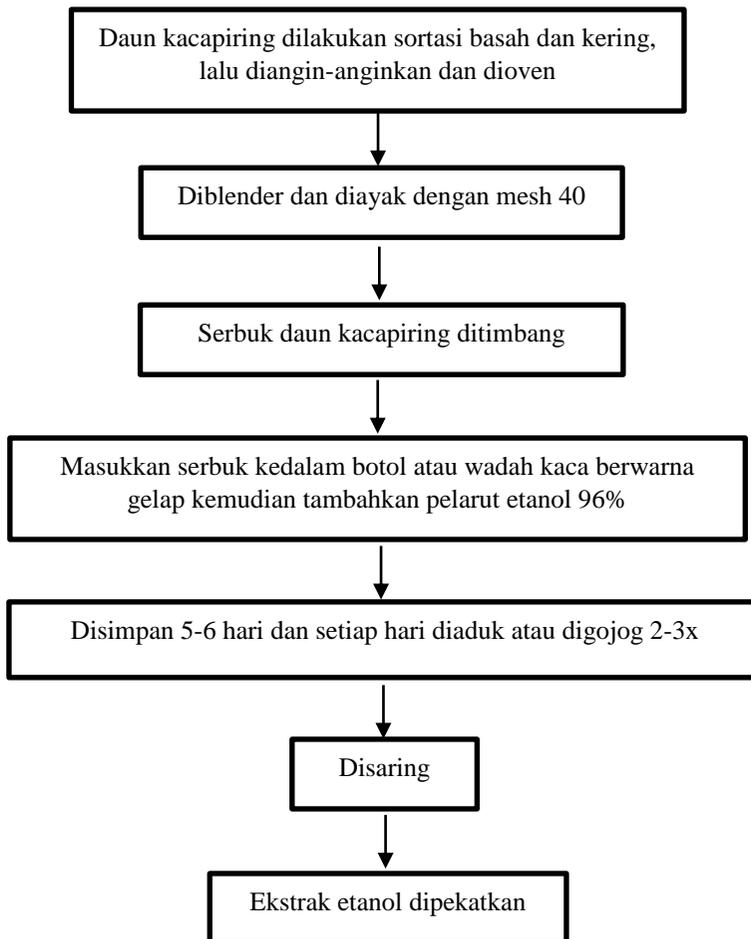
$$\% \text{ EUV} = \frac{\text{Volume ekskresi urin kumulatif per jam}}{\text{Volume loading dose}} \times 100\%$$

E. Analisis Hasil

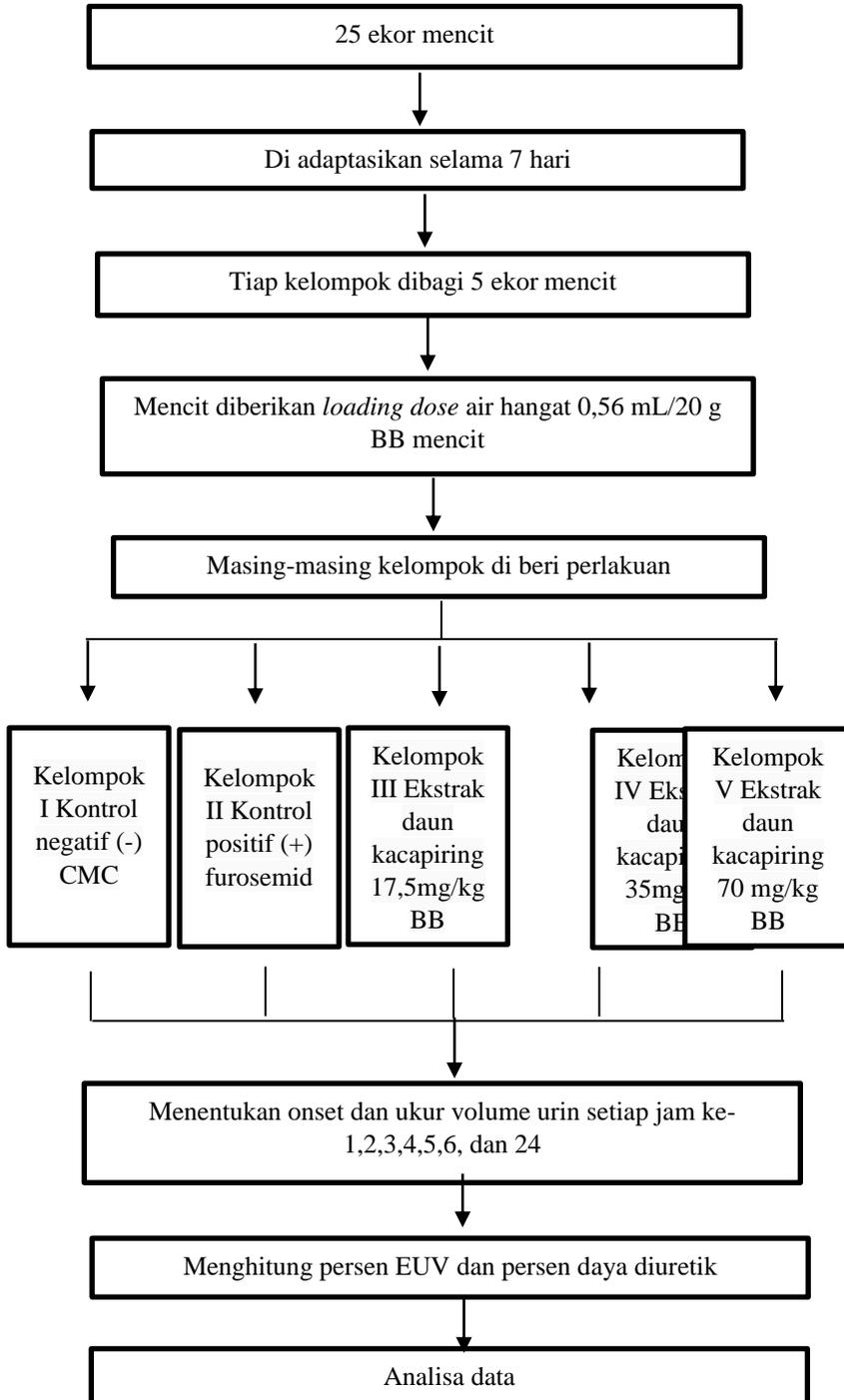
Data yang diambil pada uji diuretik adalah data onset dan volume urin serta perhitungan. Data onset adalah waktu hewan uji mulai berkemih. Volume urin adalah urin yang diambil pada jam 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 24 kemudian dihitung persen daya diuretik dan persen EUV. Dari hasil data onset dan volume urin selanjutnya dianalisa dengan uji *Shapiro-wilk*. Menurut Scheffler (1987), pengujian ini bertujuan untuk mengetahui bahwa data yang telah diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Apabila data terdistribusi normal dan variannya homogen maka data dapat diolah secara sistematis dengan anava satu jalan (*one way ANOVA*). Uji anova digunakan untuk

menilai antar kelompok apakah ada perbedaan yang bermakna sehingga dapat disimpulkan adanya aktifitas obat uji. Setelah uji anova dilanjutkan dengan uji Tukey untuk membandingkan perbedaan mean antar kelompok perlakuan (Anggraeni, 2014).

F. Alur Penelitian



Gambar 5. Skema kerja pembuatan ekstrak etanol 96% daun kacapiring



Gambar 6. Skema alur peneliti