BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis Penelitian ini tergolong jenis penelitian eksperimental laboratoris. Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Teknologi Bahan Alam dan Laboratorium Farmakologi Eksperimental Universitas Buana Perjuangan Karawang.

Rancangan penelitian dilakukan dengan menggunakan ekstrak berupa ekstrak tapak liman dan sambung nyawa yang sebelumnya dilakukan proses determinasi terlebih dahulu pada kedua tanaman tersebut untuk mengetahui secara pasti jenis tanaman yang akan digunakan pada penelitian. Setelah itu kedua tanaman diekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak yang telah didapat diberikan kepada mencit yang telah diinduksi hiperurisemia dengan jus hati ayam dan kalium oksonat selanjutnya diamati penurunan kadar asam urat mencit tersebut.

3.2 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain simplisia tapak liman, simplisia sambung nyawa, pelarut etanol 70%, jus hati ayam, pakan mencit standar (pur babi), air mineral, sekam, allopurinol, aquadest, tisu, kapas, alumunium foil, H_2SO_4 pekat, HCl pekat, $CHCl_3$, kalium oksonat, CH_3COOH glasial, $FeCl_3$ 1%, serbuk Mg, bismuth subnitrat, kalium iodide, asam asetat dan CMC-Na 1%.

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *rotary evaporator* (IKA), neraca digital (Taffware), timbangan hewan (Ohauss), *oven* (IKA), blender (Phillips), kertas saring, alat tes strip asam urat (Family Dr.), spuit (Disposable Syringe), sonde oral (Gavage), box kandang mencit (Lion Star), bunsen, penjepit kayu, spatula, pipet tetes, rak tabung reaksi dan alat-alat gelas (Iwaky pyrex).

3.2.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan galur Balb-C berusia 2-3 bulan, memiliki berat badan 20-30 gram. Hewan uji yang berjumlah 27 ekor mencit dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Independen

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dari tapak liman, dan sambung nyawa.

3.3.2 Variabel Dependen

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar asam urat pada mencit jantan yang sebelumnya telah diinduksi oleh makanan yang memiliki kandungan purin tinggi yaitu jus hati ayam dan kalium oksonat.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Simplisia

Sampel berupa tanaman tapak liman dan sambung nyawa sebanyak 8 kg diambil disatu kebun dataran tinggi di Pulau Jawa dibawah pengelolaan Balai Pertanian Tanaman Rempah dan Obat (Balittro) yakni Taman Kebun Percobaan Jalan Manoko Lembang Bandung. Selanjutnya proses pengeringan hingga jadi simplisia kering sebanyak 1 kg dilakukan di Instalasi Penelitian dan Pengembangan Teknologi Pertanian (IP2TP) Manoko. Kemudian simplisia yang sudah diserbukan dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi di Balai Pertanian Tanaman Rempah dan Obat (Balittro) Bogor. Identifikasi/ Determinasi dilakukan di LIPI Biologi Cibinong untuk memastikan kebenaran simplisia.

3.3.2 Ekstraksi

Serbuk simplisia tapak liman dan simplisia sambung nyawa diekstraksi menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi sehingga mendapatkan hasil ekstrak cair. Ekstrak cair dipekatkaan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghasilkan ekstrak kental.

Ekstrak yang didapt dihitung rendemen ekstrak dengan rumus :

$$\%\text{Rendemen} = \frac{Bobot\ total\ ekstrak}{Bobot\ Serbuk\ simplisia} \text{ x } 100\%$$

3.3.3 Pemeriksaan Ekstrak

Pemeriksaan ekstrak meliputi bobot jenis, organoleptik, dan uji kandungan kimia ekstrak (skrining fitokimia).

A. Bobot Jenis

Piknometer kosong dan kering ditimbang (W0). Selanjutnya dikalibrasi dan ditimbang untuk menentukan berat piknometer yang berisi air yang telah dipanaskan pada tempratur 25°C (W1). Kemudian masukan ekstrak cair kedalam piknometer kosong dan timbang (W2) (Rahmiani 2019).

$$\text{Bobot Jenis} = \frac{W2-W0}{W1-W0} \text{X BJ. Air}$$

B. Organoleptik

Idenifikasi organoleptik meliputi bentuk, warna, bau dan rasa dengan menggunakan pancaindera untuk mendeskripsikannya(Rahmi 2017).

C. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat di dalam tanaman. Skrining fitokimia meliputi uji alkaloid, flavonoid, tannin, quinon, polifenolat, saponin, monoterpenoid & sesquiterpenoid serta triterpenoid & steroid.

1. Alkaloid

Sebanyak 1 g ekstrak dilarutkan dalam 10 ml $CHCl_3$ (Kloroform) dan 4 tetes NH_4OH selanjutnya disaring dan filtratnya dimasukkan kedalam tabung reaksi. Filtrat dikocok dengan ditambah 10 tetes H_2SO_4 2M, sampai terbentuk 2 lapisan. Kedua lapisan yang dipisahkan kedalam tabung reaksi berbeda dan ditambahkan pereaksi mayer pada tabung pertama jika menghasilkan endapan putih positif alkaloid sedangkan tabung kedua ditambahkan perekasi dragendroff jika positif alkaloid menimbulkan endapan merah jingga (Nugrahani, Andayani, and Hakim 2016).

2. Flavonoid

Sebanyak1 g ekstrak dimasukan kedalam gelas piala dilarutkan dalam 10 ml aquades dan panaskan sampai mendidih selama 5 menit.

Selanjutnya disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dipindahkan kedalam tabung reaksi lalu tambahkan mg stearat, 1 ml HCl pekat dan 1 ml amilalkohol kemudian kocok kuat. Jika terbentuk warna merah, kuning dan jingga pada lapisan maka positif flavonoid (Nugrahani et al. 2016).

3. Tannin

   Sebanyak 1 g ekstrak ditambahkan 10 ml aquades dan panaskan hingga mendidih selama 5 menit. Selanjutnya filtrat ditambahkan $FeCl_3$ 1%. Hasil positif terbentuknya warna hijau kehitaman (Nugrahani et al. 2016).

4. Kuinon

   Sebanyk 1 g ekstrak ditambahkan 10 ml aquades dan panaskan hingga mendidih selama 5 menit. Selanjutnya filtrat disaring dan didapatkan filtratnya, filtrat ditambahkan 2-3 tetes larutan kalium hidroksida 5%. Hasil positif terbentuknya warna kuning hingga merah (Fajriaty et al. 2017).

5. Saponin

   Sebanyak 1 g ekstrak ditambahkan 10 ml aquades dan panaskan hingga mendidih selama 5 menit. Selanjutnya filtrat disaring dan masukan kedalam tabung reaksi tertutup kemudia kocok kuat selama 10 detik dan biarkan selama 10 menit, tambahkan 1 ml HCl 2M. Adanya saponin ditunjukan dengan buih yang stabil (Nugrahani et al. 2016).

6. Triterpenoid & steroid

   Sebanyak 1 g ekstrak dilarutkan dalam metanol dan uapkan. Filtrat digerus dan tambahkan2 m kloroform, 10 tetes anhidrat asetat selanjutnya 3 tetes H_2SO_4 pekat. Hasil ditunjukan berupa kecoklatan menunjukan positif triterpenoid, sedangkan muncul warna hijau menunjukan positif steroid (Nugrahani et al. 2016).

3.3.4 Pengujian terhadap Mencit Hiperurisemia

Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit putih jantan galur Balb-C yang berumur 2-3 bulan dan berat rata-rata 20-30 gram. Mencit

yang berjumlah 27 ekor akan dikelompokkan menjadi 9 kelompok, dengan masing-masing hewan uji terdiri dari 3 ekor. Pada penelitian ini menggunakan tiga variasi dosis 100 mg/Kg BB, 300mg/Kg BB dan 500mg/Kg BB yang diperoleh hasil orientasi.

KN : Kontrol normal, tidak diberi perlakuan apapun.

K - : Kontrol negatif, diberikan jus hati ayam dan kalium oksonat selama 12 hari sebanyak 2 kali sehari kemudian pada hari ke 12 hingga ke 15 diberi CMC-Na 0,5 %.

K + : Kontrol hiperurisemia, diberikan jus hati ayam dan kalium oksonat selama 12 hari sebanyak 2 kali sehari kemudian pada hari ke 12 hingga ke 15 diberi allopurinol 10 mg/kg BB.

P1 : Percobaan Ekstrak tapak liman, diberikan jus hati ayam dan kalium oksonat selama 12 hari sebanyak 2 kali sehari kemudian pada hari ke 12 hingga ke 15diberi ekstrak etanol Tapak liman dosis 100, 300 dan 500 mg/kg BB per oral.

P2 : Percobaan Ekstrak sambung nyawa, diberikan jus hati ayam dan kalium oksonat selama 12 hari sebanyak 2 kali sehari kemudian pada hari ke 12 hingga ke 15 diberi ekstrak etanol sambung nyawa dosis 100, 300 dan 500 mg/kg BB per oral (Cendrianti, Muslichah, and Ulfa 2013).

Hewan uji sebelum diberi perlakuan hanya diberi minum dan dipuasakan kurang lebih 12 jam. Pengukuran pertama dilakukan sebagai pengecekan kadar asam urat awal (normal). Selanjutnya hewan uji dibuat hiperurisemia dengan memberikan jus hati ayam dan kalim oksonat yang diberiakan pada hari ke 7 hingga ke 12 secara peroral. Pada hari kedua belas dilakukan pengambilan darah untuk mengukur asam uratnya. Kemudian hewan hewan uji beri suspensi sediaan uji secara oral. Setelah hari kelima belas maka dilakukan pengambilan darah untuk mengukur kadar asam urat terakhir. Kadar asam urat dalam darah diukur pada hari ke 0, 12 dan 15. Pengambilan darah mencit dilakukan dengan cara melukai ekor mencit. Kadar asam urat diukur menggunakan metode POCT *(Point of Care Testing)*dengan menggunkan alat UA Sure.

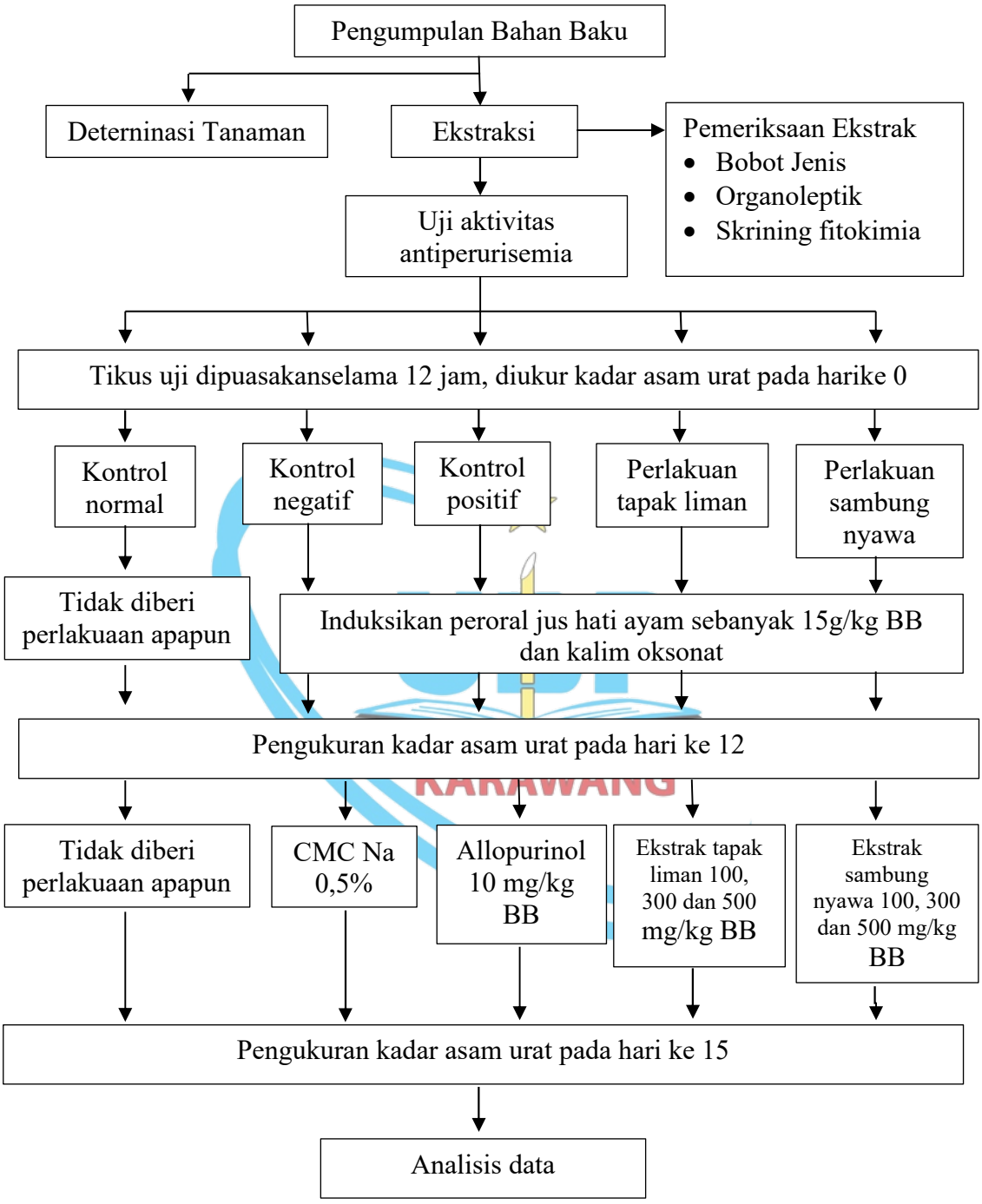
Selanjutnya dilakukan perhitungan persentase penurunan (%P) kadar asam urat dari data yang didapat, kadar asam urat dengan persamaan (Kristiani, Dan Subarnas, and Subarnas 2013).

$$\%P = \frac{Kadar(-) - Kadar\ (p)}{kadar\ (-)}\ x\ 100\%$$

Keterangan : Kadar (p) = kadar asam urat darah kelompok uji

Kadar (-) = kadar asam urat darah kelompok kontrol negatif

3.3.5 Diagram Penelitian



Gambar 1. Diagram Penelitian

3.4 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan program SPSS untuk menguji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan uji normalitas (*Lavene)* yang dilakukan untuk syarat uji analisis variasi satu arah (ANOVA) dengan membaca perbedaan antara dua atau lebih kelompok pengujian dan diikuti uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Jika terdapat syarat uji ANOVA tidak terpenuhi, maka dilakuakn pengujia dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dengan melihat perbedaannya dan selanjutnya diikuti uji *Mann Whitney* (Cendrianti et al. 2013).

UBP
KARAWANG