BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang secara eksperimental di Laboratorium Universitas Buana diberikan kepada hewan uji yang telah diinduksi hiperurisemia dengan jus hati ayam dan selanjutnya diamati penurunan kadar asam urat terhadap hewan uji tersebut.Perjuangan Karawang. Untuk rancagan penelitian, Ekstrak yang digunakan berupa ekstrak jombang dan sintrong yang telah diekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak yang telah didapat

3.2 Hewan Uji

hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan dengan galur Bulb-C dengan berat rata-rata 20-30 gram dan berumur 2-3 bulan. Yang diperoleh dari perternakan *Kyputpetshop* Bekasi Timur. Penggunaan mencit jantan ini dilakukan berdasarkan pertimbangan tingakatan stres dan perubahan hormonal yang dimana mencit jantan lebih stabil dari pada mencit betina (Juwita, 2017).

3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain simplisia jombang, simplisia sintrong, palarut etanol 70%, CMC-Na, jus hati ayam, kalium oksonat, pur babi, allopurinol, mencit jantan, aquadest, tisu, kapas, alumunium foil, H_2SO_4 pekat (p.a.), HCl pekat (p.a.), $CHCl_3$ (p.a.), CH_3COOH glasial (p.a.), $FeCl_3$ 1%, serbuk Mg, Bismuth subnitrat, kalium iodat dan mayer (teknis).

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain rotary evaporator (IKA), neraca analitik digital (Tafferware), neraca ohaus (Pioneer), blender (philips), seperangkat alat gelas (Iwaki), spuit dengan jarum suntik (Disposable Syringe), sonde oral (Gavage), *test strip uric acid* (Family. Dr), penangas listrik (Maspion), penjepit kayu, tabung reaksi (Iwaki), spatula, batang pengaduk, pipet tetes, rak tabung reaksi.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Independen

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol jombang dan ekstrak etanol sintrong.

3.4.2 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.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Simplisia Tanaman Uji

Sampel berupa tanaman Jombang dan Sintrong diambil disatu kebun dataran tinggi di Pulau Jawa dibawah pengelolaan Balai Pertanian tanaman Rempah dan Obat bogor (Balittro) yakni Taman Kebun Percobaan Jalan Manoko Lembang Bandung. Selanjutnya dilakukan proses determinasi guna memastikan kebenaran tanaman yang digunakan, proses ini dilakukan di LIPI Biologi Cibinong. Kemudian tanaman melalui proses pengeringan hingga jadi simplisia kering, hal ini dilakukan di instalasi penelitian dan Pengembangan Teknologi Pertanian (IP2TP) Manoko.

3.5.2 Proses Ekstraksi

Serbuk simplisia jombang dan simplisia sintrong diekstraksi menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi dengan perbandingan 1:5, yaitu 1 Kg simplisia dan 5 liter pelarut sehingga mendapatkan hasil ekstrak cair. Ekstrak cair dipekatkaan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghasilkan ekstrak kental.

3.5.3 Pemeriksaan Ekstrak

1. **Rendemen**

   Rendemen merupakan suatu perbandingan antara berat produk kering yang dihasilkan dengan berat bahan baku (Pasilala, 2016). Dan menurut Dewatisari (2018), rendemen berkaitan dengan jumlah kandungan bioaktif yang tersaring atau yang terkandung dalam tumbuhan tersebut, semakin tinggi angka

rendemen yang dihasilkan maka semakin tinggi pula kandungan senyawa yang tertarik pada bahan baku tersebut.

2. Organoleptik

Pemeriksaan organoleptik ekstrak bertujuan untuk mengetahui karakteristik fisik suatu ekstrak tanaman, khususnya bentuk, rasa bau dan warna.

3. Bobot Jenis

Penetapan bobot jenis ekstrak dapat dilakukan dengan cara menimbang piknometer dalam keadaan kosong dan ditimbang. Lalu kemudian piknometer trsebut diisi dengan ekstrak sampel yang akan diuji dan ditimbang kembali. Kemudian dilakukan hal yang sama dengan mengganti sampel dengan air. Lakukan perbandingan berat sampel dan Kerapatan air dapat ditentukan. Piknometer dikosongkan dan diisi penuh dengan ekstrak, lalu ditimbang. Bobot jenis dapat diartikan sebagai perbandingan antara kerapatan suatu zat dengan kerapatan air dengan nilai massa persatuan volume. Pengujian bobot jenis penting dilakukan karena bertujuan untuk memberi batasan mengenai besarnya massa persatuan volume yang dimana merupakan parameter khusus ekstrak cair hingga menjadi ekstrak kental yang dapat dituang. Bobot jenis juga berkaitan dengan kemurnian ekstrak (Maryam, 2020).

4. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengetahui suatu komponen senyawa aktif yang terkandung pada sampel (Muthminnah, 2019). Uji skrining fitokimia ini meliputi:

a) Uji alkaloid

Ekstrak dilarutkan dengan 5 mL HCl 2N. Larutan yang didapat dibagi menjadi 2 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan pereaksi Mayer 3 tetes dan tabung kedua diberi pereakdi *Dragendroff* sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan putih hingga kekuningan pada tabung pertama dan endapan jingga pada tabung kedua menunjukan adanya alkaloid.

b) Uji flavonoid

Ekstrak ditambahkan 5 mL aquadest dan panaskan, kemudian saring untuk memndapatkan filtrat lalu dinginkan. Kemudian filtrat ditambahkan serbuk Mg, 5 mL HCl dan amil alkohol hingga terbentukya warna menunjukan adanya flavonoid.

c) Uji tanin

Ekstrak ditambahkan 5 mL aquadest dan panaskan, kemudian saring untuk memndapatkan filtrat lalu dinginkan. Kemudian filtrat ditambahkan gelatin 1%, terjadinya perubahan warna menjadi keruh atau adanya endapan putih menunjukan adanya tanin.

d) Uji polifenolat

Ekstrak ditambahkan 5 mL aquadest dan panaskan, kemudian saring untuk memndapatkan filtrat lalu dinginkan. Kemudian filtrat ditambahkan FeCl3 1% kemudian menunjukan perubahan warna menjadi biru hitam menunjukan adanya polifenolat.

e) Uji quinon

Ekstrak ditambahkan 5 mL aquadest dan panaskan, kemudian saring untuk memndapatkan filtrat lalu dinginkan. Kemudian filtrat ditambahkan KOH 5% kemudian menghasilkan warna kuning hingga merah menunjukkan adanya quinon.

f) Uji saponin

Ekstrak ditambahkan 5 mL aquadest dan panaskan, kemudian saring untuk mendapatkan filtrat, lalu dinginkan. Kemudian filtrat dikocok vertikal selama 10 detik, jika menimbulkan busa yang tidak kurang dari 1 menit dan tidak hilang setelah penambahan HCl 2N maka sampel menunjukkan adanya saponin.

g) Uji Mono & Sesquiterpenoid

1 gr esktrak ditambahkan 5 mL eter dan gerus, kemudian filtrat di pipet dan dipindahkan pada cawan penguap. Lalu filtrat dibiarkan mengering dan kemudian ditambahkan panilin 10% dan H2SO4

pekat. Apabila terjadi perubahan warna maka sampel menunjukkan adanya Mono & Sesquiterpenoid.

h) Uji Triterpen dan Steroid

1 gr esktrak ditambahkan 5 mL eter dan gerus, kemudian di pipet dan dipindahkan pada cawan penguap. Lalu filtrat dibiarkan mengering dan kemudian ditambahkan LB jika terjadi perubahan warna menjadi ungu maka sampel positif terpenoid, dan apabila terjadi perubahan warna menjadi biru hijau maka sampel positif steroid.

3.5.4 Pengujian terhadap mencit hiperurisemia

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur Bulb-C dengan berat badan rata-rata 20-30 gram dan berusia 2-3 bulan. Hewan uji total berjumlah 27 ekor mencit kemudian dibagi menjadi 9 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor. Dosis ekstrak tanaman yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 100 mg/kg BB, 300 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB yang diperoleh dari hasil orientasi.

KN : Kontrol normal, tidak diberi perlakuan apapun.

K - : Kontrol negatif, mencit diberikan secara oral pakan standar dan jus hati ayam selama hingga hari ke 6 dan dilanjutkan dengan pemberian jus hati ayam ditambahkan dengan kalium oksonat 2 kali sehari hingga hari ke 12 yang selanjutnya pada hari ke 12 sampai ke 15 dilakukan pemberian CMC-Na 0,5 %

K + : Kontrol positif, mencit diberikan secara oral pakan standar dan jus hati ayam selama hingga hari ke 6 dan dilanjutkan dengan pemberian jus hati ayam ditambahkan dengan kalium oksonat 2 kali sehari hingga hari ke 12 yang selanjutnya pada hari ke 12 sampai ke 15 dilakukan pemberian allopurinol 10 mg/kg BB.

P1A : Pengujian ekstrak jombang, mencit diberikan secara oral pakan standar dan jus hati ayam salama hingga hari ke 6 dan dilanjutkan dengan pemberian jus

hati ayam ditambahkan dengan kalium oksonat 2 kali sehari hingga hari ke 12 yang selanjutnya pada hari ke 12 sampai ke 15 dilakukan pemberian ekstrak etanol jombang dosis 100 mg/kg BB per oral.

P2A : mencit diberikan secara oral pakan standar dan jus hati ayam selama hingga hari ke 6 dan dilanjutkan dengan pemberian jus hati ayam ditambahkan dengan kalium oksonat 2 kali sehari hingga hari ke 12 yang selanjutnya pada hari ke 12 sampai ke 15 dilakukan pemberian ekstrak etanol jombang dosis 300 mg/kg BB per oral.

P3A : Pengujian ekstrak jombang, mencit diberikan secara oral pakan standar dan jus hati ayam selama hingga hari ke 6 dan dilanjutkan dengan pemberian jus hati ayam ditambahkan dengan kalium oksonat 2 kali sehari hingga hari ke 12 yang selanjutnya pada hari ke 12 sampai ke 15 dilakukan pemberian ekstrak etanol jombang dosis 500 mg/kg BB per oral.

P1B : Pengujian ekstrak sintrong, mencit diberikan secara oral pakan standar dan jus hati ayam selama hingga hari ke 6 dan dilanjutkan dengan pemberian jus hati ayam ditambahkan dengan kalium oksonat 2 kali sehari hingga hari ke 12 yang selanjutnya pada hari ke 12 sampai ke 15 dilakukan pemberian ekstrak etanol sintrong dosis 100 mg/kg BB per oral.

P2B : Pengujian ekstrak jombang, mencit diberikan secara oral pakan standar dan jus hati ayam selama hingga hari ke 6 dan dilanjutkan dengan pemberian jus hati ayam ditambahkan dengan kalium oksonat 2 kali sehari hingga hari ke 12 yang selanjutnya pada hari ke 12 sampai ke 15 dilakukan pemberian ekstrak etanol jombang dosis 300 mg/kg BB per oral.

P3B : Pengujian ekstrak jombang, mencit diberikan secara oral pakan standar dan jus hati ayam selama hingga hari ke 6 hari dan dilanjutkan dengan pemberian jus hati ayam ditambahkan dengan kalium oksonat 2 kali sehari hingga hari ke 12 yang selanjutnya pada hari ke 12 sampai ke 15 dilakukan pemberian ekstrak etanol jombang dosis 500 mg/kg BB per oral.

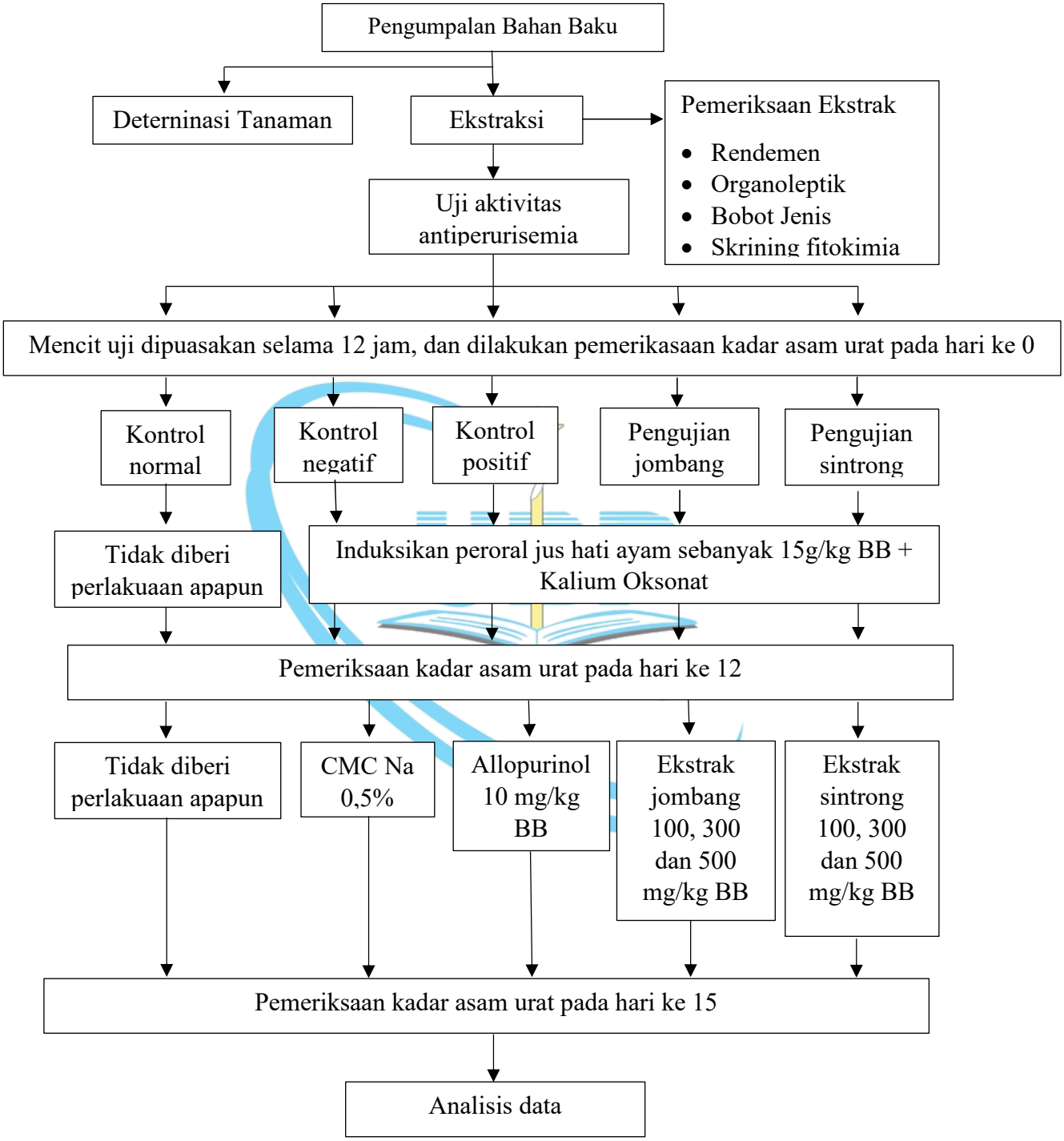
Hewan uji sebelum diberi perlakuan hanya diberi minum dan dipuasakan kurang lebih 8 jam. Pengukuran pertama dilakukan sebagai pengecekan kadar asam urat awal (normal). Selanjutnya hewan uji dibuat hiperurisemia dengan memberikan jus hati ayam secara peroral. Setelah hari kedua belas dilakukan pemeriksaan kadar asam urat sebagai hasil akhir untuk menujukkan ada atau tidaknya penurunan kadar asam urat. Pengambilan darah mencit dilakukan dengan cara meluaki ekor mencit, pengecekan dilakukan dengan menggunakan metode POCT (*Point of Care Testing*) dengan menggunakan alat *UA Sure*. Selanjutnya dilakukan perhitungan persentase (%P) kadar asam urat dari data yag telah didapat sebelumnya dengan persamaan :

$\%P = \frac{\text{kadar } (-) - kadar\ (p)}{\text{kadar } (-)}$ x 100% (Kristiani and Subarnas, 2013).

3.6 Analisis Data

Analisis data Menggunakan program SPSS dengan melihat uji normalitas (Shapiro-Wilk) dan uji homogenitas (Lavene) yang digunakan sebagai syarat uji analisis varian satu arah ANOVA untuk melihat perbedaan rata-rata dari dua atau lebih kelompok perlakuan dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Jika salah satu syarat untuk uji ANOVA tidak dipenuhi, maka dilakukan uji Kruskal-Wallis untuk melihat adanya perbedaan, selanjutnya dilakukan uji MannWhitney (Cendrianti, *et al.*, 2013).

3.7 Diagram Alir Penelitian



Gambar 1. Alur Penelitian