

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium, menggunakan hewan uji tikus jantan galur wistar sebanyak dua puluh ekor dibagi menjadi lima kelompok dimana satu kelompok terdiri dari empat ekor tikus. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui dosis terbaik dari pengobatan tertentu.

### 3.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini memiliki populasi yaitu hewan uji tikus putih jantan galur wistar dan ekstrak etanol daun *C.costata* sebagai sampel. Daun *C.costata* diperoleh di sekitar Hutan Tangkahan Taman Nasional Gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Utara Sumatera. Daun *C.costata* kemudian dibuat menjadi ekstrak etanol daun *C.costata*. Pengujian efek diuretik menggunakan ekstrak etanol daun *C.costata* dilakukan pada lima kelompok tikus selama 24 jam.

### 3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

#### 3.3.1 Bahan

Tikus putih jantan galur wistar sebanyak 20 ekor, ekstrak etanol daun *C.costata*, Etanol 70% (One Med), Aquadest (PT. Brataco), Furosemid<sup>®</sup>40 mg (PT. Kimia Farma), Larutan Infus NaCl (B Braun), PGA 1%, makan dan minum tikus.

#### 3.3.2 Alat

Alat yang digunakan adalah Spektrofotometer Serapan Atom, maserator, *rotary evaporator* (Eyela<sup>®</sup>), tabung reaksi (Pyrex<sup>®</sup>), gelas beaker (Herma<sup>®</sup>), penangas air (Memmer<sup>®</sup>), mortar dan stemfer (Onemed<sup>®</sup>), *disposable syringe* 1 cc (Onemed<sup>®</sup>), cawan porselen, batang pengaduk, kaca arloji, timbangan analitik, sonde oral (Onemed), sendok logam, pot urin, kertas pH universal (Nesco<sup>®</sup>), kandang tikus, tempat makan dan minum tikus.

### 3.4 Variabel Penelitian

#### 3.4.1 Klasifikasi Variabel

##### a. Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun *C.costata* dengan beberapa variasi dosis yang berbeda.

##### b. Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini yaitu volume urin pada tikus putih jantan galur wistar.

##### c. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dari penelitian ini yaitu bobot tikus, volume pemberian, makanan dan jenis kelamin hewan uji.

#### 3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Berikut tabel definisi operasional variabel pada penelitian ini, yaitu :

**Tabel 3.1** Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat ukur	Skala	Hasil ukur
1	Variabel Bebas Dosis ekstrak etanol daun <i>C.costata</i>	5 kelompok perlakuan dengan menggunakan obat furosemid, PGA, Penginduksi dan 3 kelompok terapi ekstrak etanol dengan dosis yang bervariasi	-	Nominal	1. K normal = Pemberian aquadest 2. K+ = Kontrol positif dosis furosemid 3. D1 (100 mg/kg BB) = Kelompok terapi dosis 4. D2 (200 mg/kg BB) = Kelompok terapi dosis 5. D3 (400 mg/kg BB) = Kelompok terapi dosis
2	Variabel Terikat Volume urin	Mengukur volume urin	-	Interval	1. Rendah 2. Tinggi
	Uji Kadar K dan Na	Menguji kadar kalium dan natrium dalam urin	Spektrofotometer serapan atom	Interval	1. Rendah 2. Tinggi

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Penyiapan Sampel

Daun *C.costata* yang telah diambil di sekitar hutan Tangkahan Taman Nasional Gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Sumatera Utara, kemudian dicuci sampai bersih dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan sampai menjadi simplisia kering dan ditimbang.

#### 3.5.2 Determinasi Tumbuhan

Tujuan dilakukan determinasi untuk menentukan kebenaran sampel. Deskripsi tata nama meliputi nama ekstrak, nama latin tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan dan nama tumbuhan indonesia (Maryam *et al.*, 2020). Determinasi dilakukan di Herbarium Jatinangor, Taksonomi Tumbuhan Laboratorium Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjadjaran.

#### 3.5.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cep-cepan

Simplisia daun *C.costata* sebanyak 5 kg dimaserasi dalam etanol 70% selama 3x24 jam untuk mendapatkan ekstrak cair, kemudian dilakukan pemekatan ekstrak menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental, setelah itu diencerkan dalam air suling untuk memvariasikan dosis sesuai kebutuhan (Alkandahri *et al.*, 2021).

#### 3.5.4 Pemeriksaan Hasil Rendemen

Pengukuran hasil rendemen dilakukan dengan membandingkan massa ekstrak kering (gr) dengan massa awal bahan sebelum proses ekstraksi (gr). Perhitungan ini dilakukan untuk mengetahui persentase dari jumlah bahan yang tersisa dari proses ekstraksi dan mengetahui tingkat keefektifan dari proses yang dihasilkan (Senduk *et al.*, 2020). Perhitungan dari persentase hasil rendemen dapat dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot total ekstrak}}{\text{Bobot serbuk simplisia}} \times 100\%$$

#### 3.5.6 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak etanol daun *C.costata*.

a. Uji Alkaloid

Ekstrak yang ingin diuji dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditetesi HCl 2N, kemudian dibagi menjadi beberapa tabung reaksi. Setiap tabung ditambahkan dengan masing-masing reagen. Positif mengandung alkaloid ketika ditambahkan reagen Mayer membentuk endapan putih atau kuning. Positif mengandung alkaloid jika ditambahkan reagen Bouchardat menghasilkan warna coklat sampai endapan hitam. Positif mengandung alkaloid jika ditambahkan pereaksi Dragendorff dan membentuk endapan jingga sampai merah-coklat (Syamsul *et al.*, 2020).

b. Uji Flavonoid

Sepuluh tetes ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 2 tetes HCl pekat, lalu tambahkan serbuk magnesium dan amil alkohol. Jika terdapat warna kuning, orange atau merah terjadi pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Syamsul *et al.*, 2020).

c. Uji Tanin

Sebanyak 10 tetes ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 2 tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Positif mengandung tanin jika terbentuk warna biru atau hijau kehitaman (Syamsul *et al.*, 2020).

d. Uji Saponin

Sebanyak sepuluh tetes ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 10 mL air panas, dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, busa yang stabil akan terus terlihat selama 5 menit dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes larutan HCl 2 N, apabila busa tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Syamsul *et al.*, 2020).

e. Uji Triterpenoid & Steroid

Ekstrak dimasukkan sedikit dalam tabung reaksi kecil, lalu dikocok dengan sedikit eter. Lapisan eter diambil lalu diteteskan pada plat tetes, dan dibiarkan sampai kering. Setelah kering, ditambahkan dua tetes asam asetat anhidrat dan satu tetes asam sulfat pekat. Apabila terbentuk warna orange, merah atau kuning berarti positif terpenoid. Tetapi apabila terbentuk warna hijau berarti positif steroid (Maryam *et al.*, 2020).

### 3.5.7 Pembuatan Bahan Penginduksi

a. Pembuatan PGA 1% b/v

Ditimbang 10 mg PGA dalam 1 mL aquadest dipanaskan hingga suhu 70°C. PGA kemudian dimasukkan sedikit demi sedikit kedalam air yang telah dipanaskan sambil diaduk hingga homogen.

b. Larutan Penginduksi NaCl 25 mL/kgBB

Ditimbang bobot tikus setelah didapat disesuaikan dengan dosis induksi NaCl 25 mL/kgBB. Setelah itu diambil larutan infus NaCl sesuai dengan perhitungan dosis yang telah disesuaikan.

c. Larutan Furosemid 10 mg/kgBB

Ditimbang bobot tikus, setelah didapat disesuaikan dengan dosis induksi Furosemid 10 mg/kgBB. Setelah itu ditimbang bobot Furosemid sesuai dengan perhitungan dosis yang telah disesuaikan. Serbuk Furosemid dan PGA yang telah ditimbang dimasukkan kedalam beaker glass, tambahkan aquadest sedikit demi sedikit aduk hingga homogen.

d. Pembuatan suspensi ekstrak etanol daun cep-cepan

Berat badan tikus ditimbang, setelah didapat disesuaikan dengan dosis induksi ekstrak etanol daun *C.costata* dengan 3 rasio dosis, ditimbang ekstrak etanol daun *C.costata*, masukkan ke dalam labu takar kemudian disuspensikan dengan PGA 1% b/v sedikit demi sedikit hingga homogen.

### 3.5.8 Penyiapan Hewan Uji

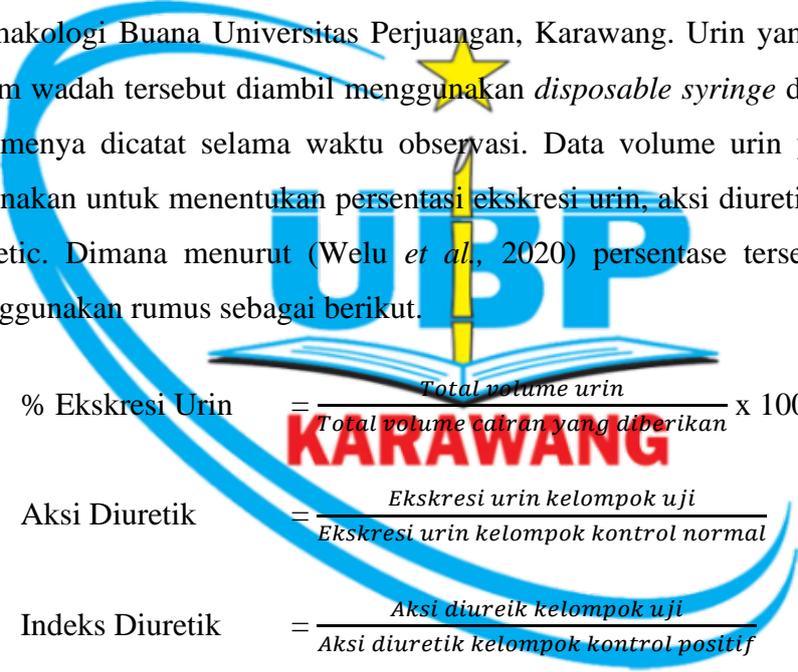
Tikus jantan yang digunakan berumur 10-11 minggu dengan bobot badan 200-250 gram, sebanyak 20 ekor tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus yang sebelumnya perlakuan tikus diadaptasi selama 3 hari dengan pemberian pakan hewan.

### 3.5.9 Uji Aktivitas Diuretik

Sebelum pengujian, tikus jantan putih galur Wistar ditempatkan setiap hari selama 3 jam dengan total 3 hari di dalam kandang metabolik, untuk aklimatisasi. Tikus dipuaskan semalaman untuk makanan tetapi tetap diberi minum untuk dihidrasi menggunakan dosis oral tunggal normal salin 25 mL/kg BB. Pada awal pengujian, kandung kemih tikus yang dipuaskan tetapi terhidrasi

dikosongkan dengan menekan lembut di daerah panggul dan menarik ekornya. Tikus diberikan dosis uji, untuk kelompok kontrol normal diberi aquadest, kelompok kotrol positif diberi larutan furosemide 10 mg/kgBB dan kelompok uji I, II, III diberi dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB. Segera setelah pemberian, tikus ditempatkan secara individual di kandang terpisah (Welu *et al.*, 2020).

Hasil volume ekskresi urin dikumpulkan dan diukur pada akhir jam ke-1, jam ke-2, jam ke-4, jam ke-6, dan dengan interval 24 jam terakhir setelah pemberian dosis. Pengukuran volume air seni dilakukan di Laboratorium Farmakologi Buana Universitas Perjuangan, Karawang. Urin yang ditampung dalam wadah tersebut diambil menggunakan *disposable syringe* dan kemudian volumenya dicatat selama waktu observasi. Data volume urin yang didapat digunakan untuk menentukan persentase ekskresi urin, aksi diuretik dan indeks diuretic. Dimana menurut (Welu *et al.*, 2020) persentase tersebut dihitung menggunakan rumus sebagai berikut.



$$\begin{aligned} \% \text{ Ekskresi Urin} &= \frac{\text{Total volume urin}}{\text{Total volume cairan yang diberikan}} \times 100 \\ \text{Aksi Diuretik} &= \frac{\text{Ekskresi urin kelompok uji}}{\text{Ekskresi urin kelompok kontrol normal}} \\ \text{Indeks Diuretik} &= \frac{\text{Aksi diureik kelompok uji}}{\text{Aksi diuretik kelompok kontrol positif}} \end{aligned}$$

Data indeks diuretik yang diperoleh dibandingkan dengan skala diuretic pada tabel berikut.

**Tabel 3.2** Skala Diuretik (Welu *et al.*, 2020)

Indeks Diuretik	Keterangan
> 1,5	Aktivitas diuretik kuat
1-1,5	Aktivitas diuretik sedang
0,72-0,99	Aktivitas diuretik lemah
<0,72	Tidak memiliki aktivitas diuretik

Sampel urin kumulatif (24 jam) diukur pH nya menggunakan kertas pH universal. Kadar  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$  diukur dengan spektrofotometer serapan atom. Pengujian Kadar  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$  dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran Jatinangor. Selanjutnya data kadar  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$  digunakan untuk menentukan indeks natriuretik, dimana menurut (Welu *et al.*, 2020) indeks tersebut dihitung menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Indeks Natriuretik} = \frac{\text{Kadar Natrium kelompok uji}}{\text{Kadar Kalium kelompok uji}}$$

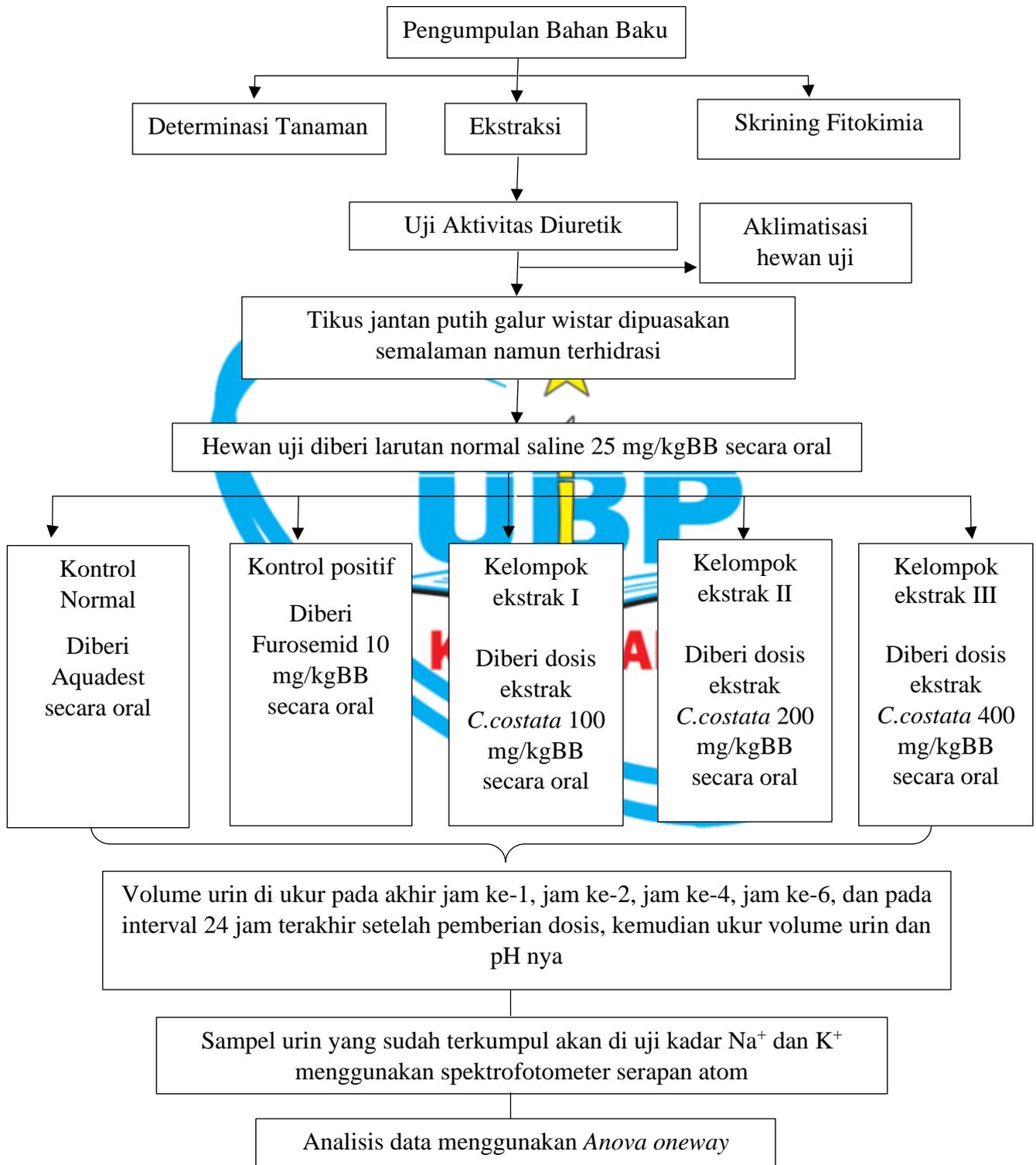
### 3.5.10 Cara Kerja Alat Spektrofotometri Serapan Atom

- Menyalakan Main valve tabung gas yang akan digunakan Metode Flame, Udara (kompresor) dan Gas Acetylene (Analisa *flame acetylene*)
- Menyalakan Power UPS dengan menekan tombol “ On “
- Menyiapkan kebutuhan analisa (larutan baku, lampu katode, aquabides dan sebagainya)
- Menyalakan Monitor dan CPU Komputer
- Menyalakan Instrumen AAS Shimadzu 6650 F sesuai metode yang digunakan (Shimadzu Europe, 2000) (Sugito *et al.*, 2022).

### 3.6 Analisis Data

Hasil penelitian ditampilkan sebagai nilai rata-rata  $\pm$  SEM. Pengujian statistik menggunakan *One ways analisis varians* (ANOVA) dilakukan untuk menentukan perbedaan dalam nilai rata-rata antara kelompok perlakuan dan mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) di setiap kelompok (Alkandahri *et al.*, 2021).

### 3.7 Diagram Alir Penelitian



**Gambar 3.1** Diagram Penelitian