

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Memfaatkan desain studi eksperimental laboratorium, tikus putih jantan galur wistar selaku hewan uji. Hewan uji total 20 ekor tikus di kelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan yakni anggota kontrol positif furosemide, kelompok normal dengan PGA serta anggota uji bersama pemberian fraksi etil asetat daun cep- cepan.

3.2 Populasi dan Sampel

Sampel dimanfaatkan ialah daun *C.costata* (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC) yang didapatkan dari Hutan Tangkahan Taman Nasional Gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Sumatera Utara yang banyak dihuni oleh suku Karo. Daun *C.costata* (*Castanopsis costata* (Blume) A. DC) ini kemudian dibuat menjadi ekstrak daun *C.costata* (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC) setelah dibuat menjadi ekstrak lalu di fraksi menggunakan etil asetat dengan dosis 100mg,200mg,dan 400mg. Tikus jantan Galur Wistar ini didapatkan dari Mitra Putra Animal Rancaekek Bandung dengan BB tikus 200-300 gr.

3.3 Bahan dan alat

3.3.1 Bahan Penelitian

Bahan pada studi ini lain daun kering *C.costata* , Furosemide 40 mg (PT. Kimia Farma®), NaCl, PGA 1%,Etil asetat , aquadest. tikus putih jantan galur wistar bersama umur 15-20 minggu bersama bobot rata-rata 200-300 gram, makanan dan minuman.

3.3.2 Alat Penelitian

Alat studi ini yaitu mortir dan stamper (Onemed®), corong bushner (Herma®), Corong pisah (Pyrex®), *rotary evaporator* (Eyela®), tabung reaksi

(Pyrex®), beaker glass (Herma®), batang pengaduk (Rofa®), sonde (Onemed®), handscoon (Sensi latex®), spuit 1 cc (Onemed®), maserator.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Klasifikasi Variabel

a. Variabel bebas

Variabel bebas studi ini yaitu fraksi ekstrak etanol daun *C.costata* bersama beberapa variasi dosis yang berbeda.

b. Variabel terikat

Kadar Kalium (K) dan Natrium (Na) tikus jantan putih galur wistar.

c. Variabel Terkendali

Yaitu bobot tikus, volume pemeberian, makanan, jenis kelamin, hewan uji.

3.4.2 Definisi operasional variabel

Berlandaskan tabel diartikan operasional variabel pada studi ini, yaitu:

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Standar

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
1	Variabel bebas Dosis Fraksi etil asetat daun <i>C.costata</i>	5 kelompok perlakuan dengan menggunakan obat sebagai kontrol positif dengan obat furosemide, kontrol normal dengan pga , Dan dosi 1,2,3 menggunakan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun <i>C.costata</i>	-	Nominal	1. Kontrol Positif Furosemide 10 mg/kgBB 2. Kontrol normal masing masing tikus 1% PGA dan aquadest 3. Dosis 1 (100 mg/kgBB) = Kelompok terapi dosis 4. Dosis 2)200 mg/kgBB) = Kelompok terapi dosis 5. Dosis 3 (400 mg/kgBB) = Kelompok terapi dosis.

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
2	Variabel Terikat	Mengukur Urine tikus	-	Interval	Nominal
	Total Na+ dan K+	Menguji kadar natrium dan kaliun dalam urin	Spektrofotometer serapan atom	Interval	Ratio
	Penentuan efek diuretik	Menghitung dan menjumlahkan hasil dari pengukuran volume urin	-	-	Nominal

3.5 Rancangan Penelitian

3.5.1 Preparasi Sampel

1. Pembuatan Ekstrak dengan Metode Maserasi

Daun *C.costata* serbuk (5 kg) dimaserasi secara menyeluruh dalam etanol 70% selama 72 jam. Ekstrak cair yang didapat selanjutnya dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C.

2) Pembuatan Fraksi etil asetat daun *C.costata*

Ditimbang 50 g ekstrak etanol daun cep-cepan, larutkan dalam beaker gelas 500mL menggunakan alkohol 70% hingga larut lalu tambahkan air sebanyak 1:3 bagian atau 150 mL lalu tambahkan Etil asetat sebanyak 450 mL, aduk homogen masukan ke dalam corong pisah di kocok sesekali kran atas di buka untuk mengeluarkan gas, kocok sampai 3x tunggu hingga terpisah fase air dan fraksi. Lalu buang fase air dan ambil fase fraksi masukan ke dalam rotary evaporator dan kentalkan dalam penangas air (*water bath*) hingga menjadi ekstrak.

3) Pembuatan larutan PGA 1%

Ditimbang 1 gram PGA bersama 50 mL aquadset dipanaskan hingga suhu 70°C. PGA selanjutnya di masukan amat demi sedikit kedalam air yang telah di panaskan sambil diaduk hingga homogen. Selanjutnya di ad kan

hingga 100 mL sertalarutan PGA di masukkan kedalam wadah yang tertutup baik.

4) Pembuatan Larutan Furosemide 10 mg/kgBB

Ditimbang bobot tikus, setelah didapat disesuaikan dengan dosis induksi Furosemide 10 mg/kgBB. Karena sifatnya tidak larut air maka digunakan gom arab untuk membuat larutan suspensi (Depkes R1,1995). serbuk Furosemide kemudian dilarutkan dengan PGA 1% dalam beaker glass aduk ad homogen dan diberikan secara oral.

4) Pembuatan suspensi Fraksi etil asetat daun *C.costata*

Ditimbang bobot tikus, setelah didapat disesuaikan dengan dosis induksi ekstrak etanol daun *C.costata* (*Castanopsis costata*) dengan 3 perbandingan dosis, ditimbang Fraksi etil asetat daun *C.costata* (*Castanopsis costata*), dimasukkan kedalam beaker glass lalu di larutkan dengan PGA 1% aduk sampai larut.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pengelompokan Perlakuan Pada Tikus

Sebelum pengujian, tikus jantan putih galur wistar diaklimatisasi selama 1 minggu, dipelihara dalam kondisi yang sama, diberi makan dan minum. Hewan uji agar menghasilkan aktivitas diuretik dengan diberi obat fusoremide 10mg/kg yang diberikan pada saat awal pengujian. 20 ekor tikus dibagi mempunyai 5 bagian anggota tiap-tiap 4 ekor tikus bersama anggota normal menggunakan PGA 1%, kelompok positif dengan furosemide 40mg/kg dan dosis 1 100mg dosis 2 200mg dan dosis 3 400 mg. Pengukuran urine sampel dilakukan selama jam ke-1, ke-2, ke-4, ke-6, ke-12, serta ke-24. Lalu diukur volumenya dan kadar natrium (Na) dan kalium (K) nya. Rumus pengelompokkan tikus memanfaatkan rumus federer :

$$(n-1) (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) (5-1) \geq 15$$

$$(n-1) (4) \geq 15$$

$$(n-1) \geq \frac{15}{4}$$

$$(n-1) \geq 3$$

$$n \geq 1+3 = 4 \text{ sample}$$

Keterangan : t : jumlah anggota perlakuan

n : jumlah sampel

3.6.2 Pemeriksaan Hasil Rendemen

Penentuan hasil dilakukan dengan membandingkan massa (g) ekstrak kering dengan massa awal (g) bahan sebelum proses ekstraksi. Sampel dikeringkan dalam oven hingga diperoleh berat konstan, kemudian diperoleh ekstrak kering. Perhitungan ini dilakukan untuk mengetahui persentase jumlah sisa material dari proses ekstraksi dan untuk mengetahui tingkat efisiensi dari proses yang dihasilkan (Senduk *et al.*, 2020). Perhitungan persentase nilai rendemen dapat dilakukan dengan rumus berikut:

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

3.6.3 Determinasi

Determinasi tumbuhan dimaksudkan untuk mengetahui kebenaran sampel. Pernyataan nomenklatur meliputi nama ekstrak, nama latin tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan, dan nama tumbuhan Indonesia. (Maryam *et al.*, 2020).

Tumbuhan daun *C.costata* (*Catanopsis costata* (blume) A.DC) di determinasi di herbarium jatinangor departemen biologi FMIPA universitas padjajaran bandung.

3.6.4 Skrinning fitokimia

1. Saponin

Saponin dibagi 2 macam berlandaskan struktur kimia ragam saponinnya,

yakni: steroidal saponin serta triterpenoid saponin.

Prosedur : Setelah memasukkan 10 tetes ekstrak ke dalam tabung reaksi, tambahkan 10mL air panas, dinginkan, dan kocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika busa stabil terus muncul selama 5 menit dan busa tidak hilang bahkan setelah menambahkan 1 tetes larutan HCl 2N, berarti ada saponin (Syamsul *et al*,2020).

2. Tanin

Sepuluh tetes ekstrak digolongkan bersama tabung reaksi kemudian dimasukan 2 tetes FeCl₃ 1%. Terjadi warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan terdapat senyawa tannin (Syamsul *et al*, 2020).

3. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polar karena memiliki banyak gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi. Senyawa flavonoid ini dapat digunakan sebagai antibakteri, infeksi luka, antijamur, antivirus, antikanker dan antitumor. Flavonoid juga dapat digunakan sebagai antibakteri, antialergi, sitotoksik, dan antihipertensi (Sriningsih, 2008).

Prosedur : 0,5 g bahan tanaman murni ditimbang dan ditambahkan 10 mL metanol dan direfluks selama 10 menit. Filtrat disaring panas melalui kertas saring berlekuk dan diencerkan dengan 10 mL air suling. Setelah dingin, tambahkan 5 mL minyak tanah eter, kocok perlahan, dan diamkan. Lapisan metanol dihilangkan. Penguapan di bawah tekanan pada 40 °C. Residu kemudian dilarutkan dalam 5 mL etil asetat.

4. Alkaloid

Masukkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 2N HCl tetes demi tetes. Kemudian dibagi menjadi beberapa tabung reaksi. Setiap tabung dibubuhi dengan masing-masing reagen. Ambil 3 tetes filtrat dan tambahkan 2 tetes pereaksi Mayer hingga terbentuk endapan putih atau kuning. Ketika pereaksi Meyer positif yang mengandung alkaloid ditambahkan, terbentuk endapan putih atau putih kekuningan. Ambil 3 tetes filtrat dan bila terbentuk

endapan berwarna coklat sampai hitam, tambahkan 2 tetes pereaksi hingga pereaksi Bouchardat positif mengandung alkaloid. Ambil 3 tetes filtrat lalu tambahkan 2 tetes reagen ke dalam reagen. dragendrof positif terkandung alkaloid apabila membentuk endapan jingga sampai merah coklat (Syamsul *et al*, 2020).

5. Terpenoid

Total 0,5 gram ekstrak bersama tabung reaksi ditambahkan 2 mL etanol 70% selanjutnya diaduk, ditambahkan 1 mL klorofom serta 1 mL asetat anhidrida lalu didinginkan. Sesudah dingin ditambahkan H₂SO₄. Apabila terjadi warna kemerahan, menyampaikan adanya triterpenoid (Ghosal dan Mandal, 2012).

6. Steroid

Total 0,5 gram ekstrak bersama tabung reaksi ditambahkan 2 mL etanol 70% kemudian diaduk, ditambahkan 2 mL klorofom, selanjutnya dinaikan 2 mL H₂SO₄ pekat bersama strategi diteteskan pelan-pelan dari sisi dinding tabung reaksi. Pembentukan cincin warna merah menunjukkan adanya steroid (Ghosal serta Mandal, 2012).

3.6.5 Uji Organoleptik

Pengenalan selaku fisik bersama memanfaatkan panca indera bersama menguraikan bentuk, bau, warna, rasa, ukuran (Maryam *et al*, 2020).

3.7 Uji Aktivitas Diuretik

Pengukuran urin tikus dilakukan setiap jam nya pada jam ke-1,2,4,6,12 serta 24 jam. Urin yang tertampung pada wadah dapat diambil bersama memanfaatkan spuit 1 cc lalu di simpan kedalam pot urine di catat setiap volumenya selama waktu pengamatan. Pengukuran sample Natrium (Na) dan Kalium (K) dilakukan menggunakan metode spektrofotometer serapan atom di universitas padajajaran bandung dengan jumlah sampel masing-masing 5-10 mL.

3.8 Penentuan Efek Diuretik

Penentuan efek diuretik didasarkan pada pengukuran output urin. Data keluaran urin kemudian dimanfaatkan agar menjumlahkan laju ekskresi urin, efek diuretik serta kegiatan diuretik yang dihitung pandangan Mamundkk (2003) serta Mahmoodkk (2004). yakni:

$$\text{Ekresi urin (\%)} = \frac{\text{Total cairan yang diberikan (mL)}}{\text{Total volume urin}} \times 100\%$$

$$\text{Kerja Diuretik} = \frac{\text{Ekresi urin (\%)} \text{ kelompok perlakuan tikus}}{\text{ekresi urin (\%)} \text{ kelompok kontrol normal}}$$

$$\text{Aktivitas Diuretik} = \frac{\text{Kerja diuretik kelompok perlakuan}}{\text{Kerja diuretik obat}}$$

Selain itu, data aktivitas diuretik yang diperoleh disandingkan bersama skala diuretik Gujral (Mahmood, 2004). Pada skala diuretik Gujral, skor aktivitas diuretik kurang dari 0,72 menunjukkan ialah aktivitas diuretik belum ada. 0,72 hingga 1,0 menunjukkan diuretik yang lemah. 1,0 hingga 1,5 adalah diuretik bersama efek diuretik sedang. Kian dari 1,5 bermakna diuretik yang kuat.

3.9 Analisis Data

Hasil penelitian ditampilkan sebagai nilai rata-rata \pm SEM. Pengujian statistika menggunakan *One ways analisis varians* (ANOVA) dilakukan agar menetapkan ragam nilai rata-rata antara ragam perlakuan. Kemudian disambung bersama uji Tukey HSD agar menentukan apakah terdapat ragam relevan ($p < 0,05$) pada tiap-tiap anggota (Alkandahri *et al*, 2021).

