

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1 Penyiapan Bahan Uji dan Determinasi

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar sereh wangi (*Cymbopogon nardus* L. Rendle) yang diperoleh dari Kampung Cikancung, Desa Mekarhurip, Kecamatan Sukawening, Kabupaten Garut, Jawa Barat. Determinasi dilakukan di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi FMIPA UNPAD.

4.2 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia merupakan tahapan awal dalam mengidentifikasi kandungan kimia yang terdapat dalam akar sereh wangi (*Cymbopogon nardus* L. Rendle) karena pada tahap ini dapat ditentukan golongan senyawa kimia yang dikandung. Penapisan fitokimia meliputi pengujian terhadap golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, polifenolat, kuinon, monoterpen dan sesquiterpen, triterpenoid dan steroid (Farnsworth, 1996: 245-246).

4.2.1 Uji Alkaloid

Simplisia atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi lalu diasamkan dengan asam klorida 2N, lalu disaring. Filtrat dibasakan dengan larutan amonia 10% (v/v), kemudian ditambahkan kloroform dan dikocok kuat-kuat. Lapisan kloroform disaring, kemudian ditambahkan asam klorida 1 N lalu dikocok kuat-kuat sampai terdapat dua lapisan kembali. Lapisan asam dipipet dan dibagi kedalam tiga tabung. Pada tabung 1 ditambahkan 3-4 tetes pereaksi Mayer apabila timbul endapan putih atau kekeruhan

menandakan positif alkaloid, pada tabung 2 ditambahkan 3-4 tetes pereaksi Dragendroff apabila timbul endapan jingga-kuning atau kekeruhan menandakan positif alkaloid, dan tabung sebagai blangko (Farnsworth, 1996: 245-253).

4.2.2 Uji Flavonoid

Simplisia atau ekstrak sebanyak satu spatel ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan akuades 2 mL, kemudian dicampur dengan serbuk magnesium dan asam klorida 2 N, dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Kepada filtrat ditambahkan amil alkohol lalu dikocok kuat-kuat dan timbulnya warna merah kuning, jingga pada lapisan amil alkohol menandakan positif flavonoid (Farnsworth, 1996: 262-263).

4.2.3 Uji Tanin

Simplisia atau ekstrak sebanyak satu spatel ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan akuades 2 mL, lalu dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Pada filtrat ditambahkan 3-4 tetes larutan gelatin 1% dan adanya endapan putih menandakan positif tanin (Farnsworth, 1996: 262-263).

4.2.4 Uji Polifenolat

Simplisia atau ekstrak sebanyak satu spatel ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan akuades 2 mL, lalu dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Pada filtrat ditambahkan 3-4 tetes larutan pereaksi besi (III) klorida dan timbulnya warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1996: 262-263).

4.2.5 Uji Kuinon

Simplisia atau ekstrak sebanyak satu spatel ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan akuades 2 mL, lalu dipanaskan di atas penangas air dan disaring.

Pada filtrat ditambahkan 2-3 tetes larutan kalium hidroksida 5% dan timbulnya warna kuning hingga merah menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1996: 262-263).

4.2.6 Uji Monoterpen dan Sesquiterpen

Simplisia atau ekstrak sebanyak satu spatel digerus dengan eter lalu disaring. Filtrate ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan 2-3 tetes larutan vanillin 10 % dalam asam sulfat pekat dan timbulnya warna-warna menandakan positif senyawa monoterpen dan sesquiterpen (Farnsworth, 1996: 262-263).

4.2.7 Uji Saponin

Simplisia atau ekstrak sebanyak satu spatel ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan air secukupnya, kemudian dipanaskan diatas penangas air selama 30 menit dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dibiarkan sampai dingin, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik dengan arah vertikal dan terjadinya busa setinggi ± 1 cm yang bertahan selama 10 menit menandakan positif saponin dan busa tersebut masih bertahan (tidak hilang) setelah ditambahkan beberapa tetes asam klorida (Farnsworth, 1996: 258-259).

4.2.8 Uji Triterpenoid dan Steroid

Simplisia atau ekstrak sebanyak satu spatel digerus dengan eter lalu disaring. Filtrate ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan 3-4 tetes larutan pereaksi Liebermann Burchad dan terjadinya warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan bila warna hijau-biru menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1996: 259-260).

4.3 Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara membersihkan tabung penerima dan pendingin dengan asam pencuci, kemudian dibilas dengan air, lalu keringkan dalam lemari pengering. Ke dalam labu kering dimasukkan sejumlah simplisia timbang sebanyak 25 g. Untuk zat yang dapat menyebabkan gejalak tambahkan batu didih ke dalam labu tersebut dimasukkan lebih kurang 200 mL toluene, kemudian hubungkan alat. Tuangkan toluene jenuh ke dalam tabung penerima (R) melalui alat pendingin. Panaskan labu hati-hati selama 15 menit. Setelah toluene mulai mendidih, suling dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes tiap detik hingga sebagian air tersuling. Kemudian naikan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, cuci bagian dalam pendingin dengan toluena, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambung dengan kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluena, lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Biarkan tabung penerima mendingin hingga suhu kamar. Jika ada tetes air yang melekat pada pendingin tabung penerima, gosok dengan karet yang diikat pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluena hingga tetesan air turun. Setelah air dan toluena memisah sempurna, baca volume air dengan ketelitian 0,005 mL. Volume yang terbaca disebut sebagai volume destilasi kedua (n'). kadar air dihitung dalam persen (%) dengan persamaan (Ditjen POM, 2000: 15):

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{Volume air (mL)} \times B_{\text{air}} \left(\frac{g}{\text{mL}}\right)}{\text{Berat Simplisia Awal (g)}} \times 100\%$$

4.4 Pembuatan Ekstrak Etanol

Maserasi dilakukan dengan cara sebanyak 1 kg akar sereh wangi diblender kasar lalu dimasukkan dalam maserator, kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% maserasi dilakukan sebanyak 3x24 jam sekali-kali dilakukan pengadukan. Setelah didapat ekstrak cair selanjutnya dilakukan penguapan dengan alat evaporator dan dilanjutkan diatas penangas air sampai diperoleh ekstrak kental.

4.5 Penyiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar yang berumur ± 2 bulan dengan berat antara 130-200 g. Hewan dipelihara selama 1 minggu. Kemudian selalu diamati kondisinya melalui penimbangan berat badan. Tikus dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor tikus. Sebelum dilakukan pengujian, tikus dipuasakan terlebih dahulu selama ± 18 jam tetapi tetap diberi minum dan sebelum dimulai pengujian tikus diadaptasikan selama 7 hari diruang percobaan dan diadaptasikan 1 jam di kandang metabolisme sebelum pengujian.

4.6 Pengelompokan Hewan Coba

Tikus dikelompokkan menjadi 5 kelompok, dimana masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Kelompok kontrol diberi akuades 10 mL/kg BB. Kelompok kontrol positif diberi hidroklorotiazid 2,25 mg/kg BB secara oral. Kelompok uji I, II, dan III diberi ekstrak etanol akar sereh wangi dengan dosis I adalah 14,75 mg/kg BB, dosis II adalah 33,2 mg/kg BB, dan dosis III adalah 62,5 mg/kg BB. Pembuatan suspensi dalam percobaan ini menggunakan pensuspensi CMC-Na 0,5%.

4.7 Uji Aktivitas Diuretik

Uji aktivitas diuretik pada penelitian ini dimulai dengan pemberian air hangat 15 mL/kg BB pada setiap perlakuan kelompok tikus. Kelompok kontrol diberi akuades 10 mL/kg BB secara peroral. Kelompok uji I, II, dan III diberi ekstrak etanol akar sereh wangi dengan dosis I adalah 14,75 mg/kg BB, dosis II adalah 33,2 mg/kg BB, dan dosis III adalah 62,5 mg/kg BB secara peroral. Kemudian tikus dimasukkan kedalam alat uji diuretik yaitu kandang metabolisme yang masing-masing satu ekor dari setiap kelompok dengan 5 kandang metabolisme, lalu dilihat volume urin yang ditampung selang waktu satu sampai enam jam. Setelah enam jam perlakuan, semua tikus dilihat volume urin yang disekresikan dan potensi diuretiknya ditentukan dengan menghitung persentase volume total urin dari selang waktu jam ke-1 sampai jam ke-6 dan jam ke-24 terhadap volume awal pemberian air hangat 15 mL/kg BB yang diberikan secara peroral pada tikus. Perhitungan persentase potensi diuretik menggunakan rumus (Turner, 1963: 26-28) :

$$\text{Potensi diuretik (\%)} = \frac{\text{volume urin yang ditampung}}{\text{volume air hangat yang diberikan}} \times 100\%$$

4.8 Analisis Data

Mengetahui ada atau tidaknya perbedaan bermakna efek diuretik antara kelompok uji, kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif. Maka dilakukan uji statistik dengan metode ANOVA dengan selang kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan uji Dunnet.