

## **BAB IV**

### **PROSEDUR PENELITIAN**

#### **4.1. Pengambilan dan Penyiapan Bahan Uji**

Sampel buah pare segar diperoleh dari perkebunan di daerah Cianjur, Jawa Barat. Bahan di sortasi basah dengan cara memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lain dari tanaman seperti tanah, kerikil, rumput dan pengotor lainnya. Pencucian dengan air bersih untuk menghilangkan tanah atau kotoran yang melekat pada tanaman. Bahan tanaman dirajang dan dikeringkan kemudian dirajang kembali sampai menjadi serbuk simplisia.

#### **4.2. Determinasi Tumbuhan**

Buah pare yang masih segar diamati bentuk daun, tangkai, bunga, buah, dan biji. Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, ITB, Bandung.

#### **4.3. Pembuatan Ekstrak**

Metode ekstraksi menggunakan pelarut dilakukan dengan cara dingin, yaitu maserasi. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 800 g dimasukkan ke dalam maserator yang telah dilapisi kapas. Kemudian ditambahkan etanol 70% perlahan-lahan hingga seluruh bagian terendam. Bagian atas maserator ditutup untuk menghindari penguapan pelarut dan didiamkan selama 24 jam. Maserat dipisahkan setiap sehari sekali kemudian diganti dengan pelarut yang baru selama

3x24 jam. Semua maserat yang diperoleh dimasukan ke dalam *vacum rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan kecepatan 30 rpm untuk menguapkan pelarut (etanol) hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh ditimbang, kemudian rendemen ekstrak dihitung dan dinyatakan dalam persen, dengan rumus sebagai berikut (Harbone, 1996) :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

#### 4.4. Penapisan Fitokimia

Prosedur penapisan fitokimia yang dilakukan menurut (Farnsworth, 1996:245-266) meliputi uji golongan senyawa alkaloid, monoterpenoid, seskuiterpenoid, flavonoid, tanin, polifenol, triterpenoid, steroid, kuinon, dan saponin.

##### 4.4.1. Uji golongan senyawa alkaloid

Simplisia dibasakan dengan amonia encer 25%, kemudian ditambah 20 ml kloroform, digerus kuat-kuat. Lapisan kloroform dipipet sambil disaring, kemudian ke dalamnya ditambahkan asam klorida 2 N. Campuran dikocok kuat-kuat hingga terdapat dua lapisan. Lapisan asam dipipet, kemudian dibagi menjadi tiga bagian: kepada bagian 1 ditambahkan pereaksi Mayer. Terjadi endapan atau kekeruhan diamati, bila terjadi kekeruhan atau endapan berwarna putih, berarti dalam simplisia terkandung alkaloid. Kepada bagian 2 ditambahkan pereaksi Dragendorff. Terjadinya endapan atau kekeruhan diamati. Bila terjadi kekeruhan atau endapan berwarna jingga kuning, berarti dalam simplisia kemungkinan terkandung alkaloid. Bagian 3 digunakan sebagai blanko.

#### **4.4.2. Uji golongan senyawa polifenol dan tanin**

Simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan panaskan di atas gas air, kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi 2 bagian, bagian pertama ditetesi larutan pereaksi besi (III) klorida, terbentuknya warna biru-hitam menunjukkan adanya tanin dan polifenolat alam. Bagian kedua ditambahkan dengan larutan gelatin. Adanya endapan putih menunjukkan bahwa dalam simplisia terdapat tanin.

#### **4.4.3. Uji golongan senyawa flavonoid**

Simplisia dalam tabung reaksi dicampur dengan serbuk magnesium dan asam klorida 2 N. Campuran dipanaskan di atas tangas air, lalu disaring. Filtrat dalam tabung reaksi ditambahkan amil alkohol, lalu dikocok kuat-kuat, adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya 2 fase dan terbentuknya warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol.

#### **4.4.4. Golongan senyawa saponin**

Simplisia dalam tabung reaksi dipanaskan di atas tangas air, kemudian disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok kuat secara vertikal selama sekitar 5 menit. Terbentuknya busa yang mantap dan tidak hilang selama 15 menit dengan tinggi busa minimal 1 cm menunjukkan adanya saponin (Fransworth, 1966).

#### **4.4.5. Golongan senyawa kuinon**

Simplisia dalam tabung reaksi dipanaskan di atas tangas air, kemudian disaring. Kepada filtrat ditambahkan larutan KOH 5% . Adanya senyawa kuinon ditandai dengan terjadinya warna kuning hingga merah.

#### **4.4.6. Golongan senyawa monoterpenoid dan seskuiterpenoid**

Simplisia digerus dengan eter, kemudian dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Hasil pengeringan filtrat ditambahkan larutan vanilin 10% dalam asam sulfat pekat. Terjadinya warna-warna menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan seskuiterpenoid.

#### **4.4.7. Golongan senyawa steroid dan triterpenoid**

Simplisia digerus dengan eter, kemudian dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap, kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Kepada hasil pengeringan filtrat ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Terjadinya warna ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid sedangkan adanya warna hijau biru menunjukkan adanya steroid.

#### **4.5. Penetapan Kadar Air**

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode Azeotroph, yaitu tabung penampung dan kondensor dibilas dengan air kemudian dikeringkan dalam oven. Lalu 200 ml toluena yang telah dijenuhkan dengan akuadest dimasukkan ke dalam labu destilasi. Sejumlah simplisia sebanyak 20 g dimasukkan ke dalam labu bundar. Labu didihkan perlahan-lahan selama kurang lebih 15 menit dan ditambahkan serpihan porselen. Setelah mendidih, campuran kemudian disuling dengan kecepatan 2 tetes/detik hingga sebagian besar air tersuling lalu kecepatan penyulingan dinaikkan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam kondensor dibilas dengan toluena. Selanjutnya dilakukan penyulingan

selama 5 menit, kemudian pemanasan dihentikan. Tabung penerima didinginkan sampai suhu kamar. Tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima dihilangkan. Air dan toluena dibiarkan memisah dalam tabung penerima, volume air dalam tabung penerima diamati dan kadar air dalam persen dapat dihitung (Depkes RI, 2000).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{ml air} \times \text{bobot jenis air}}{\text{bobot simplisia (g)}} \times 100\% \quad (2)$$

#### 4.6. Penetapan Kadar Abu

Lebih kurang dua sampai 2 g ekstrak dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan, ditara dan diratakan. Krus berisi ekstrak dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan kemudian ditimbang. Jika arang tidak dapat dihilangkan, dapat ditambahkan air panas, lalu disaring dengan kertas saring bebas abu. Sisa abu dan kertas saring dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan dan dipijarkan hingga bobotnya tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000).

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{bobot abu (g)}}{\text{bobot simplisia (g)}} \times 100\% \quad (3)$$

#### 4.7. Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan galur Swiss Webster yang sehat, berusia kurang lebih tiga bulan dengan berat badan sekitar 25 - 40 gram sebanyak 30 ekor. Hewan diadaptasikan dalam kandang hewan selama 14 hari dengan diberi pakan standar dan air minum secukupnya. Selama masa penyesuaian ini, dilakukan pengamatan keadaan umum dan penimbangan untuk

melihat mencit sehat yang selanjutnya akan digunakan pada penelitian. Namun sebelum percobaan dimulai, semua hewan dipuasakan  $\pm$  18 jam tetapi minum tetap diberikan.

#### **4.8. Pembuatan Larutan Koloidal Natrium CMC 0,5%**

Natrium CMC sebanyak 0,5 g dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam air suling panas ( $70^{\circ}\text{C}$ ) sambil diaduk dengan pengaduk elektrik hingga terbentuk larutan koloidal dan volumenya dicukupkan hingga 100 ml dengan air suling dalam gelas piala.

#### **4.9. Pembuatan Suspensi Allopurinol**

Dosis lazim allopurinol pada manusia adalah 100 mg per hari. Dosis allopurinol untuk mencit didapatkan dari perkalian faktor konversi manusia ke mencit yaitu 0,0026. Maka berdasarkan perhitungan dosis untuk tikus adalah 0,26 mg/20 g bb. Serbuk allopurinol dimasukkan ke dalam mortar, kemudian ditambah larutan koloidal Natrium CMC 0,5% b/v sedikit demi sedikit dan digerus sampai homogen, lalu dimasukkan ke labu ukur 100 ml dan volumenya dicukupkan dengan Natrium CMC 0,5% b/v.

#### **4.10. Pembuatan Sediaan Uji**

Ekstrak buah pare akan diberikan dalam 3 variasi dosis. Berdasarkan acuan empiris pada manusia dosis buah pare yang telah dikonversikan ke mencit yaitu 6 mg; 12 mg; dan 24 mg per 20 g bobot badan. Dosis buah pare tersebut

telah di konversi ke dalam bentuk sediaan ekstrak sesuai hasil rendemen ekstrak. Untuk membuat suspensi uji masing-masing buah pare sebanyak 6 mg; 12 mg; dan 24 mg digerus dalam mortar, ditambah larutan koloidal natrium CMC 0,5% sedikit demi sedikit sambil digerus hingga homogen, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur dan volumenya dicukupkan hingga 5 ml untuk tiap kelompok per hari.

#### **4.11. Pembuatan Sediaan Kalium Oksonat**

Agar dapat membuat kondisi hiperurisemia pada hewan uji, dosis kalium oksonat yang diberikan adalah 250 mg/kg bb tikus (Osada, *et al.*, 1993:183-188). Berdasarkan hasil perhitungan konversi dosis dari kilogram ke gram yaitu 50 mg/200 g bb tikus. Kemudian dosis tikus dikonversi ke dosis mencit yaitu 7mg/20 g bb mencit dan dilakukan peningkatan dosis menjadi 10,5mg/20 g bb untuk orientasi dosis kalium oksonat.

#### **4.12. Perlakuan Terhadap Hewan Uji**

Pada penelitian ini, hewan uji yang digunakan yaitu sebanyak 30 ekor mencit jantan galur Swiss Webster yang dibagi ke dalam 6 kelompok perlakuan secara acak. Kelompok I merupakan kelompok kontrol negatif yang diberi CMC Na 0,5%, kelompok II merupakan kontrol positif yang hanya diberi CMC Na 0,5%, kelompok III merupakan kelompok pembanding yang diberi allopurinol, serta kelompok IV, V dan VI yang merupakan kelompok uji dengan variasi dosis buah pare berturut-turut yaitu 6 mg/20 g bb; 12 mg/20 g bb; dan 24 mg/20 g bb. Pada hari ke-1 sebelum diberikan sediaan semua kelompok dilakukan pengukuran

kadar asam urat awal (t<sub>0</sub>). Setelah itu semua kelompok diberikan sediaan secara per oral selama 7 hari sesuai dengan kelompoknya yaitu kelompok I diberi CMC Na 0,5%, kelompok II diberi CMC Na 0,5%, kelompok III diberi allopurinol 0,26 mg/20 g bb, kelompok IV diberi dosis 6 mg/20 g bb, kelompok V diberi dosis 12 mg/20g bb, dan kelompok VI diberi dosis 24 mg/20 g bb. Pada hari ke-8 pada semua kelompok dilakukan pengukuran kadar asam urat yang kedua pengukuran kadar asam urat sebelum induksi (t<sub>1</sub>). Kemudian kelompok II, III, IV, V dan VI diinduksi dengan kalium oksonat dosis 10,5 mg/20 g bb secara intraperitoneal sedangkan kelompok I merupakan kontrol negatif hanya diinjeksikan NaCl 0,9% secara intraperitoneal juga. Dua jam setelah induksi, darah mencit diambil untuk dilakukan pengukuran kadar asam urat setelah induksi (t<sub>2</sub>). Kemudian diberikan sediaan lagi pada semua kelompok sesuai dengan kelompoknya masing-masing. Dua jam setelah pemberian sediaan dilakukan pengukuran kadar asam urat yang terakhir untuk melihat adanya penurunan (t<sub>3</sub>).

#### **4.13. Pengujian Kadar Asam Urat**

Pengambilan darah dilakukan dari masing-masing hewan uji pada tiap kelompok. Pengambilan darah pertama kali dilakukan sebelum semua hewan uji diberi perlakuan. Pengambilan darah kedua dilakukan setelah semua hewan uji diberi sediaan sesuai kelompok. Pengambilan darah ketiga dilakukan setelah semua hewan uji diinduksi dengan kalium oksonat. Pengambilan darah keempat dilakukan setelah semua hewan uji diberi kembali sediaan sesuai kelompok. Pengambilan darah dilakukan melalui ekor mencit dengan membersihkan terlebih dahulu ekor mencit dengan etanol. Kemudian bagian ujung ekor mencit dilukai

dengan menggunakan *cutter*, darah yang keluar kemudian diteteskan ke dalam test strip asam urat.

Kadar asam urat diukur dengan menggunakan *Blood Uric Acid Meter*. Darah yang diperoleh dari bagian ujung ekor mencit yang dilukai kemudian diteteskan ke dalam test strip asam urat dan dalam 6 detik kadar asam urat akan muncul pada layar. Nilai yang tercantum di layar menunjukkan kadar asam urat dalam mg/dl.

#### **4.14. Analisis Data**

Dari nilai kadar asam urat yang diperoleh untuk masing-masing sediaan, dilakukan Uji Statistika Analisa Varian (ANOVA) dengan uji lanjut LSD untuk mengetahui adanya perbedaan kelompok uji bermakna pada parameter pengamatan, yaitu kadar asam urat yang dibandingkan dengan kontrol dan pembanding yang diberi allopurinol.