

## **BAB IV**

### **PROSEDUR PENELITIAN**

#### **4.1 Determinasi dan Penyiapan Bahan**

Herba ruku-ruku (*Ocimum tenuiflorum* L.) yang digunakan bagian bunga, batang, dan daun. Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Manoko kecamatan Lembang, Kabupaten Bandung Barat. Determinasi dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

#### **4.2. Pembuatan Ekstrak Uji**

Maserasi dilakukan dengan cara sebanyak 1 kg simplisia herba ruku-ruku (*Ocimum tenuiflorum* L.) kemudian dimasukkan kedalam maserator, kemudian ditambahkan pelarut etanol sebanyak 96% sebanyak 13 L dan dibiarkan selama 3x24 jam kemudian dilakukan pengadukan. Setelah didapat ekstrak cair selanjutnya dilakukan penguapan dengan alat evaporator dan dilanjutkan diatas penangas air sampai diperoleh ekstrak kental.

#### **4.3. Penapisan Fitokimia pada Ekstrak dan Simplisia**

Penapisan fitokimia dilakukan pada herba ruku (*Ocimum tenuiflorum* L.) yang telah dikeringkan menjadi simplisia terlebih dahulu. Hal ini perlu dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang terkandung didalamnya. Penapisan fitokimia meliputi pengujian terhadap golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, polifenolat, tanin, kuinon, monoterpen dan sesquiterpen, triterpenoid dan steroid (Farnsworth, 1966: 245-246).

#### 4.3.1. Pemeriksaan Senyawa Alkaloid

Simplisia atau ekstrak ditempatkan pada mortir yang bersih, kemudian ditambahkan amoniak 25% lalu digerus. Tambahkan 20 mL kloroform, digerus kuat, saring dan diambil filtratnya (Larutan 1). Filtrat yang diperoleh sebagian ditambahkan asam klorida 10% sehingga akan menghasilkan 2 fase. Fase air dipisahkan (Larutan 2). Larutan 1 ditetaskan pereaksi Dragendroff. Terbentuknya warna merah atau jingga menunjukkan adanya positif alkaloid. Larutan 2 dibagi ke dalam 2 tabung, tabung pertama ditambahkan pereaksi Dragendroff, dan tabung kedua ditambahkan pereaksi Mayer. Timbulnya endapan merah bata dengan pereaksi Dragendroff atau endapan putih dengan pereaksi Mayer menunjukkan positif golongan senyawa alkaloid (Farnsworth, 1966: 254-255).

#### 4.3.2. Pemeriksaan senyawa flavonoid

Sampel dicampur dengan serbuk magnesium dan 1 mL HCl pekat. Kemudian dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Lalu ditambahkan amilalkohol kkuat hingga terjadi pemisahan. Hasil positif menunjukkan flavonoid jika terbentuk warna kuning hingga merah (Depkes RI, 1995: 168).

#### 4.3.3. Pemeriksaan Senyawa Tanin

Simplisia atau ekstrak sebanyak satu spatel ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan akuades 2 mL, kemudian dipanaskan diatas penangas air lalu disaring. Kepada filtrat ditambahkan 3-4 tetes larutan gelatin 1% dan adanya endapan putih menandakan positif tanin (Farnsworth, 1966: 264).

#### **4.3.4. Pemeriksaan Senyawa 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  $\pm 1$  cm yang bertahan selama 10 menit menandakan positif saponin dan busa tersebut masih bertahan (tidak hilang) setelah ditambahkan beberapa tetes asam klorida (Farnsworth, 1966:258).

#### **4.3.5. Pemeriksaan Senyawa Sesquiterpen dan Monoterpen**

Simplisia atau ekstrak sebanyak satu spatel digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat 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, 1966:268).

#### **4.3.6. Pemeriksaan Senyawa Kuinon**

Simplisia atau ekstrak sebanyak satu spatel ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan akuades 2 mL, kemudian dipanaskan diatas penangas air lalu disaring. Kepada filtrat ditambahkan 2-3 tetes larutan kalium hidroksida 5% dan timbulnya warna kuning hingga merah menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966: 265-266).

#### **4.3.7. Pemeriksaan Senyawa Polifenoat**

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

disaring. Kepada 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, 1966: 264-265).

#### **4.3.8. Pemeriksaan Senyawa Triterpenoid dan Steroid**

Simplisia atau ekstrak sebanyak satu spatel digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan 3-4 tetes larutan pereaksi Liebermann Burchard dan terjadinya warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan bila warna hijau-biru menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1966: 259-260).

#### **4.4. Penetapan Kadar Air**

Penetapan kadar air dikerjakan dengan cara dibersihkan tabung penerima dan pendingin dengan asam pencuci, kemudian dibilas dengan air, dikeringkan dalam lemari pengering. Ke dalam labu kering dimasukkan sejumlah simplisia ditimbang sebanyak 25 gram. Zat yang dapat menyebabkan gejala ditambahkan batu didih ke dalam labu tersebut dimasukkan lebih kurang 200 mL toluena, kemudian alat dihubungkan. Toluena jenuh dituangkan ke dalam tabung penerima melalui alat pendingin (n). Labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluena mulai mendidih, disuling dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes tiap detik hingga sebagian air tersuling. Kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluena, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan dengan kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluena, penyulingan

dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima dibiarkan mendingin hingga suhu kamar. Jika ada tetes air yang melekat pada pendingin tabung penerima, digosok dengan karet yang diikat pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluena hingga tetesan air turun. Setelah air dan toluena memisah sempurna, dibaca volume air dengan ketelitian 0,05 mL. Kadar air dihitung dalam persen (%) dengan persamaan:

$$\text{Kadar air \%} = \frac{\text{volume air ml} \times B_j \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right)}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

(Depkes RI, 2000: 14).

#### 4.5. Penetapan Kadar Sari Larut Air dan Larut Etanol

Penetapan kadar sari larut air dan larut etanol dilakukan dengan menggunakan 5 gram simplisia. Simplisia yang telah disiapkan dimaserasi selama 24 jam pada air dan juga etanol. Selanjutnya masing-masing pelarut disaring hingga didapatkan 20 mL filtrat. Filtrat dimasukkan ke cawan penguap dan diuapkan hingga kering. Selanjutnya dimasukkan ke dalam oven selama 30 menit pada suhu 105°C, dinginkan di desikator dan timbang. Lakukan cara yang sama hingga bobot konstan.

#### 4.6. Penyiapan Bobot Jenis Ekstrak

Pada penetapan bobot jenis ekstrak digunakan harus pikno kering, bersih dan telah dikalibrasi dengan penetapan bobot piknometer (W1) dan bobot air yang dipanaskan pada suhu 25 °C (W2). Suhu ekstrak cair diatur lebih kurang 20 °C dimasukkan kedalam piknometer. Kemudian masukkan ekstrak kedalam pikno kosong (W3) ( Depkes RI, 2000).

Dengan rumus penetapan bobot jenis ekstrak:

$$\text{Bobot jenis} = \frac{W3 \text{ gram} - W1 \text{ gram}}{W2 \text{ gram} - W1 \text{ gram}}$$

**Keterangan:**

W1 = Pikno kosong

W2 = Pikno + aquades

W3 = Pikno + ekstrak

#### 4.7. Penyiapan Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus jantan wistar yang berumur  $\pm$  2-3 bulan dengan berat antara 180-260 gram. Hewan dipelihara selama jangka waktu tertentu ( $\pm$  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  $\pm$  18 jam tetapi tetap diberi minum dan sebelum dimulai pengujian tikus kemudian diadaptasikan 1 jam di kandang metabolisme..

#### 4.8. Uji Efek Diuretik

Uji efek diuretik pada penelitian ini dimulai dengan pemberian air hangat pada setiap kelompok tikus. Pemberian air hangat pada hewan percobaan dimaksudkan untuk memperjelas efek diuretik yang terjadi. Volume normal urin tikus tanpa pemberian sejumlah air sangat kecil yaitu 1 mL per jam (Nurhayati, 1980:29). Berdasarkan syarat tersebut diduga volume urin tikus normal pun kurang dari 1 mL per jam. Namun kerja suatu diuretik tanpa pemberian asupan air dapat menyebabkan dehidrasi (Nurhayati, 2007: 565-567). Pemberian air hangat juga dapat membuat vasodilatasi arteriol aferen. Apabila darah yang masuk ke

glomerulus melalui arterioal aferen yang melebar meningkat maka tekanan darah kapiler glomerulus bertambah sehingga laju filtrasi glomerulus (LFG) meningkat (Sherwood,2007:565-567).

Pengujian dilakukan terhadap 5 kelompok tikus. Kemudian secara langsung diberikan sediaan pada masing-masing kelompok. Setelah itu unruk kelompok kontrol diberi suspensi CMC-Na 0,5% 10 mL/ kg BB tikus. Kelompok pembanding diberi suspensi furosemide 0,72 mg/ kg BB tikus secara peroral. Kelompok uji 1 diberi suspensi ekstrak etanol herba ruku-ruku dosis 125 mg/ kg BB tikus, kelompok uji 2 diberi suspensi ekstrak etanol herba dosis 250 mg/ kg BB tikus, dan kelompok uji 3 diberi suspensi ekstrak etanol herba ruku-ruku dosis 500 mg/ kg BB tikus.

Kemudian tikus-tikus tersebut dimasukkan dalam alat uji diuretik yaitu kandang metabolisme yang masing-masing satu ekor tikus dari setiap kelompok menempati satu kandang metabolisme, kemudian dilihat volume urin yang ditampung selang waktu satu sampai empat jam. Empat jam setelah perlakuan, semua tikus dilihat volume urin kumulatif yang diekskresikan, dan pH urin.

Daya (potensi) diuretik ditentukan dengan menghitung persentase volume total urin kumulatif selama 4 jam terhadap volume awal pemberian air hangat yang diberikan secara peroral kepada tikus.

Perhitungan persentase potensi diuretik menggunakan rumus:

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

(Turner,1963: 26-28)

#### 4.9. Uji Penetapan pH Urin

Uji penetapan pH menggunakan pH universal. Dengan cara meneteskan urin tikus pada pH universal kemudian dilihat pH urin dan dicocokkan pada kertas petunjuk untuk pH universal maka kita dapat melihat pH urin.

#### 4.10. Analisis Data

Analisis data dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan bermakna efek diuretik dari volume urin antara kelompok uji, kelompok pembanding, dan kelompok kontrol. Maka dilakukan uji statistik dengan metode ANOVA dengan selang kepercayaan 95%. Dan di lanjutkan dengan analisis Dunnet untuk lihat lebih spesifik kelompok yang memberikan efek diuretik paling efektif.