

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun mangga arumanis (*Mangifera indica L var arumanis*) diambil dari daerah Purwanto, Wonogiri. Diekstraksi di Laboraturium Universitas Setia Budi Surakarta.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun mangga arumanis (*Mangifera indica L arumanis*) diambil dari bulan Januari 2025 di Nandangkrang Purwanto, Kecamatan Purwanto, Kabupaten Wonogiri, Provinsi Jawa Tengah dengan kondisi daun tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah aktivitas ekstrak etanol daun mangga arumanis (*Mangifera indica L var arumanis*) yang diperoleh dengan metode maserasi dengan etanol 96%.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah uji efek diuretik dari ekstrak etanol daun mangga arumanis (*Mangifera indica L var arumanis*).

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah semua variable yang diteliti secara langsung. Variabel utama yang diidentifikasi dapat diklasifikasikan menjadi variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung.

Variabel bebas yaitu variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun mangga arumanis yang diujikan pada hewan uji mencit.

Variabel terkendali yaitu variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, lingkungan hidup dan kondisi laboraturium dan praktikan.

Variabel tergantung yaitu titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah

efek diuretik mencit setelah diberi ekstrak etanol daun mangga arumanis.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun mangga arumanis merupakan bagian tanaman dengan kondisi daun tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, segar, bebas dari debu, terhindar dari tanah, dan tidak terinfeksi hama. Sumber daun mangga arumanis ini diperoleh dari Nandangkrang Purwantoro, Kecamatan Purwantoro, Kabupaten Wonogiri, Provinsi Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak etanol daun mangga arumanis (*Mangifera indica L var arumanis*) adalah ekstrak yang diperoleh dengan metode maserasi yang menggunakan pelarut etanol 96% kemudian diuapkan dengan alat rotary evaporator pada suhu 60°C yang bertujuan untuk menguapkan pelarutnya hingga berupa endapan yang tidak terlalu kental dan dipekatkan dengan menggunakan oven atau waterbath pada suhu 40-50°C sampai menjadi ekstrak kental.

Ketiga, hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Jantan putih (*Mus muscular*) yang mempunyai keseragaman berat badan 20-30 gram dan berumur 2-3 bulan.

Keempat, kontrol pembanding adalah sediaan furosemide tablet 40 mg yang diproduksi oleh PT First Medipharma.

Kelima, dosis uji ekstrak daun mangga arumanis adalah dengan variasi dosis yaitu 60 mg/kgBB mencit, 120 mg/kgBB mencit, 240 mg/kgBB mencit.

Keenam, efek diuretik adalah efek peningkatan volume urine yang dilihat dari parameter yaitu persen daya diuretic dan persen EUV.

Ketujuh, dosis efektif ekstrak etanol daun mangga arumanis pada uji diuretic terhadap mencit jantan putih berdasarkan volume urine yaitu 60 mg/kgBB dan 240 mg/kgBB mencit.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu corong pyrex, blender cosmos, ayakan mesh no 40, botol kaca berwarna gelap, kain flannel, vakum evaporator RV 10 kontrol V, kaca arloji, beaker glass pyrex, oven memmert, gelas ukur pyrex, Erlenmeyer, batang pengaduk, tabung reaksi pyrex, rak tabung reaksi, kertas saring, timbangan analitik adventure, waterbath memmert, injeksi oral 1 ml,

moisture balance, kendang mencit, tempat minum mencit, dan stopwatch.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk daun manga arumanis, etanol 96%, aquadest, CMC, furosemide, dan air panas. Etanol 96% diperoleh dari toko bahan kimia yang beredar didaerah Surakarta. Bahan obat furosemide sebagai kontrol positif yang diperoleh dari apotek.

3. Hewan uji

Binatang atau hewan percobaan dalam praktikum ini adalah mencit putih Jantan (*Mus musculus*) sehat yang berumur 7-8 minggu dengan berat badan 20-30 g yang diperoleh dari Laboraturium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan Bahan atau Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah herba daun mangga arumanis (*Mangifera indica L var arumanis*) yang diperoleh dari daerah Purwantoro, Wonogiri.

2. Determinasi Tanaman Daun Mangga Arumanis

Proses identifikasi tanaman dilakukan dengan menggunakan tanaman utuh untuk menverifikasi kebenaran sampel daun mangga arumanis (*Mangifera Indica L var arumanis*) dengan merujuk pada pustaka yang dibuktikan dengan diverifikasi di Univesitas Setia Budi.

3. Pengumpulan Dan Pengeringan Daun Mangga Arumanis

Daun mangga arumanis yang akan dikeringkan dicuci bersih dengan air mengalir atau bak bertingkat dan ditiriskan, hal ini bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang melekat pada daun mangga arumanis. Setelah itu dipotong-potong kemudian dikeringkan dengan cara di oven pada suhu 55°C sampai kering dengan tujuan untuk mengurangi kadar air sehingga mencegah terjadinya pembusukan oleh mikroorganisme yaitu bakteri. Pembuatan serbuk daun mangga dilakukan dengan cara dihaluskan dengan mesin pengiling menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan no.40, kemudian dilakukan penetapan kadar air dari serbuk daun mangga arumanis. Tujuan pembuatan serbuk ini agar luas permukaan partikel bahan yang kontak dengan larutan penyaringan dapat dipeluas sehingga penyarian lebih efektif.

4. Penetapan Kadar Kelembaban

Penetapan kadar kelembaban serbuk daun mangga arumanis dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Caranya dengan menimbang serbuk daun mangga arumanis sebanyak 2 g ke dalam alat *moisture balance* pada suhu 105°C dan tunggu sampai alat memberikan tanda bunyi. Angka yang tertera pada *moisture balance* adalah persen kadar air yang dihasilkan oleh serbuk daun mangga arumanis selama proses pemanasan.

5. Pembuatan Ekstrak Daun Mangga Arumanis

Proses pembuatan ekstrak daun mangga arumanis dimulai dengan menempatkan 500 mg serbuk daun mangga arumanis dalam wadah berwarna gelap. Selanjutnya, ditambahkan etanol 96% sebanyak 5000 mL ke dalam wadah tersebut. Wadah dikocok, ditutup rapat, dan disimpan dalam ruangan yang terhindar dari sinar matahari. Selama 48 jam pertama, wadah sesekali dikocok. Setelah melewati periode tersebut, maserat kemudian disaring menggunakan kain flannel, menghasilkan ekstrak. Ampas dari proses tersebut ditambahkan kembali dengan menggunakan pelarut sebanyak 2500 mL dan di diamkan selama 24 jam. Hasil maserasi dilanjutkan dengan remaserasi dilakukan pada pengerjaan yang sama seperti sebelumnya, kemudian didapatkan filtrat dari hasil remaserasi. Filtrat yang diperoleh dari proses sebelumnya dikumpulkan secara keseluruhan. Kemudian, filtrat tersebut diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu sekitar 58°C hingga mendapatkan ekstrak yang kental.

6. Identifikasi Kandungan Kimia

6.1 Identifikasi Flavonoid. Untuk menilai kandungan flavonoid 0,5 g ekstrak daun mangga arumanis dilarutkan dalam 5 mL larutan etanol. Dari larutan sampel yang diambil sebanyak 2 mL, dicampur dengan 0,1 g serbuk Mg, dan kemudian disatukan dengan 10 tetes HCl pekat. Proses pengocokan dilakukan secara perlahan. Terbentuknya warna merah atau jingga pada campuran tersebut menandakan keberadaan flavonoid. Sebaliknya, jika muncul warna kuning jingga itu mengindikasikan adanya flavon, khalkol, dan auron (Djarot, 2020). Ekstrak dimasukkan ke dalam beaker glass dan dicampurkan dengan air panas. Setelah itu, campuran disaring dan filtratnya dialirkan kedalam tabung reaksi yang berisi butiran logam Mg, 1 mL larutan HCl 2N, dan 5 mL amil alkohol. Proses pengocokan dilakukan secara intensif. Pada saat itu, warna merah, kuning, atau

jingga yang muncul pada lapisan amil alcohol menandakan keberadaan flavonoid (Djamil & Anelia, 2009).

6.2 Identifikasi alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan melalui dua metode. Pada metode pertama, sejumlah 500 mg sampel ekstrak ditimbang dan dicampur dengan 1 Ml HCl 2N serta 9 mL air. Campuran dipanaskan selama 2 menit, didinginkan, disaring, dan pada filtratnya ditambahkan 2 tetes baouchardat. Keberadaan alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat hingga hitam. Pada metode kedua, ekstrak seberat 500 mg sampel juga ditimbang, dicampur dengan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air, dipanaskan selama 2 menit, didinginkan, dan disaring. Filtratnya diambil, kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer. Adanya alkaloid ditunjukkan oleh terbentuknya endapan putih atau kuning (Rumagit, 2020).

6.3 Identifikasi Terpenoid dan Steroid. Menggunakan metode Lieberman-Burchard (LB) yaitu 2 mg ekstrak kering dilarutkan dalam anhidrida asetat, dipanaskan sampai mendidih, didinginkan dan kemudian 1 mL H₂SO₄ pekat ditambahkan pada tabung reaksi terbentuk warna merah atau ungu menunjukkan kandungan triterpenoid (Saha, 2011).

7. Penetapan Dosis

7.1 Dosis Furosemid. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah furosemide dengan dosis 40 mg/70kg BB. Konversi dosis manusia ke mencit menjadi 0,104 mg/20 g BB. Dengan volume pemberian dari larutan stok 0,04% yaitu 0,35 mL/20 g BB.

7.2 Dosis Larutan CMC. Menimbang 0,5 g CMC kemudian ditambah dengan aquadest hangat ad 100 mL dan aduk sampai homogen. Pemberian kepada hewan uji sebanyak 0,5 mL.

7.3 Dosis Ekstrak Daun Mangga Arumanis. Dosis ekstrak daun mangga arumanis yang digunakan dalam penelitian yaitu 60 mg/kgBB, 120 mg/kgBB, dan 240 mg/kgBB mencit. Perhitungan dosis ada di Lampiran 6.

8. Pengujian Efek Diuretik

Uji efek diuretic dilakukan terhadap 5 kelompok mencit. Kemudian secara langsung diberikan sediaan pada masing-masing kelompok. Setelah itu untuk kelompok kontrol diberi suspense CMC 0,5%. Kelompok pembanding diberikan suspense furosemide 0,104 mg/20g BB secara oral. Kelompok uji 1 diberi suspense ekstrak etanol daun mangga arumanis dosis 60 mg/kgBB, Kelompok uji 2 diberi

suspense ekstrak etanol daun mangga arumanis dosis 120 mg/kgBB, dan Kelompok uji 3 diberi ekstrak etanol daun mangga arumanis dosis 180 mg/kgBB.

Uji efek diuretic dilakukan dengan mengukur volume urine kumulatif pada seluruh kelompok yaitu control pembanding, kelompok uji 1, kelompok uji 2, dan kelompok uji 3. Prosedur pengujian efek diuretic ekstrak etanol daun mangga arumanis terhadap mencit Jantan putih.

Tahap pertama, semua mencit dikelompokkan secara acak sesuai dengan kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor mencit yang dipuasakan terlebih dahulu selama 18 jam sebelum pemberian perlakuan, kemudian semua mencit Jantan putih diberikan *loading dose* air hangat sebanyak 0,56 mL/20 gBB mencit secara oral lalu ditunggu 15 menit.

Tahap kedua, masing-masing mencit putih Jantan diberi tanda sesuai dengan kelompok masing-masing. Kelompok 1 (control negative) dengan pemberian CMC 0,5%, kelompok 2 (control positif) dengan pemberian furosemide, kelompok 3 sebagai kelompok uji yaitu bahan uji ekstrak etanol daun mangga arumanis dibagi dalam 3 kelompok dosis.

Tahap ketiga, sebelum diberi obat semua mencit ditimbang, kemudian dilakukan pemberian sediaan sesuai dengan kelompok perlakuan. Pada saat pemberian obat atau pada waktu ke-0 dari kelompok kontrol positif (furosemide), kelompok kontrol negatif (CMC 0,5%), kelompok 3 dosis I, kelompok 4 dosis II, dan kelompok 5 dosis III, lalu mencit ditempatkan di dalam kandang metabolit.

Tahap keempat, selesai perlakuan diamati dan dicatat volume urine yang keluar, pengamatan dilakukan setiap 1 jam selama 6 jam.

Parameter uji diuretic yaitu volume urine dan daya diuretic. Perhitungan persentase potensi diuretic menggunakan rumus:

$$\text{AUC (Area Under the Curve)} = \frac{C_1 + C_2}{2} (t_2 - t_1)$$

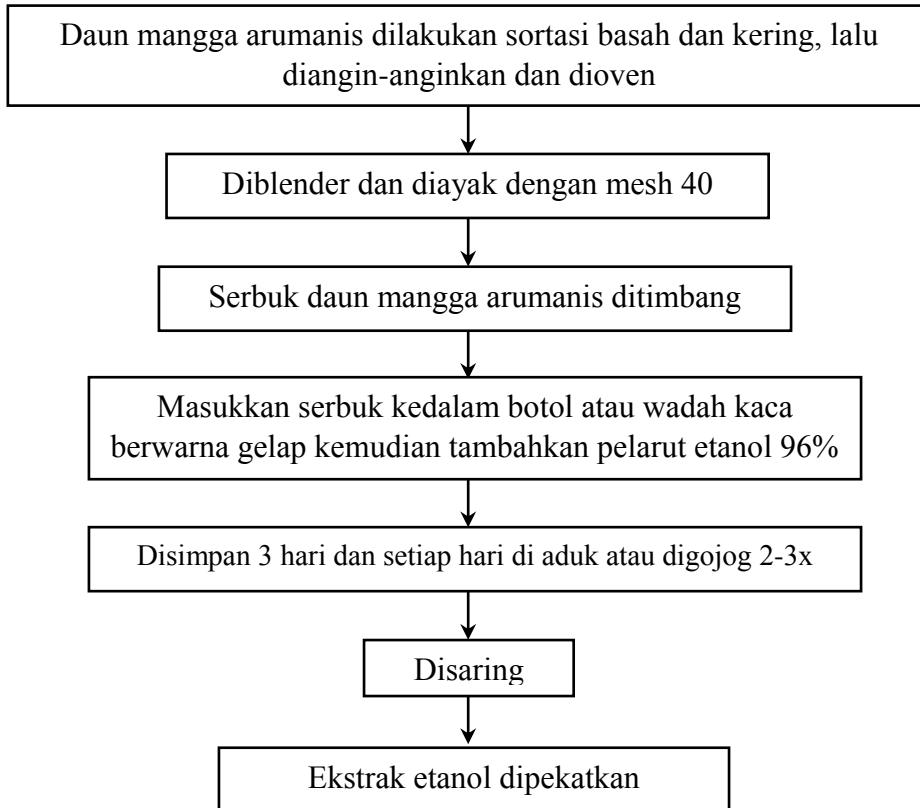
$$\% \text{ Daya Diuretik} = \frac{\text{AUC tiap perlakuan} - \text{AUC kontrol negatif CMC 0,5\%}}{\text{AUC kontrol negatif CMC 0,5\%}} \times 100$$

E. Analisis Hasil

Data yang diambil pada uji diuretik adalah data volume urine serta perhitungan. Volume urine adalah urine yang diambil pada jam 1,

2, 3, 4, 5, 6 kemudian dihitung persen daya diuretic dan persen EUV. Dari hasil data onset dan volume urine selanjutnya dianalisa dengan uji *Kolmogorof Smirnov*. Menurut Scheffler, (1987), pengujian ini bertujuan untuk mengetahui bahwa data yang telah diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Apabila data terdistribusi normal dan variannya homogen maka data dapat diolah secara sistematis dengan anova satu jalan (*one way ANOVA*). Uji anova digunakan untuk menilai antar kelompok apakah ada perbedaan yang bermakna sehingga dapat disimpulkan adanya aktifitas obat uji. Setelah uji anova dilanjutkan dengan uji Tukey untuk membandingkan perbedaan mean antar kelompok perlakuan. Jika data tidak terdistribusi normal, alternatifnya mencakup uji *Kruskal-walis*, uji *mann-whitney*, atau uji *Wilcoxon*. (Anggraeni, 2014).

F. Alur Penelitian



Gambar 4. Skema kerja pembuatan ekstrak etanol daun mangga arumanis