

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Farmakologi Departemen Farmasi FMIPA UI dari Januari 2008 hingga Mei 2008.

B. BAHAN DAN ALAT

1. Bahan

a. Simplisia Uji

Simplisia yang digunakan dalam penelitian adalah daun Gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm.) yang diperoleh di kebun Farmasi UI, Depok. Tanaman gandarusa yang digunakan dalam penelitian ini berusia 9 bulan dan telah dideterminasi oleh pusat penelitian dan pengembangan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor (Lampiran 2). Daun gandarusa yang diambil adalah daun yang terletak pada ruas ketiga sampai ruas ketujuh dihitung dari ujung tanaman.

b. Hewan Uji

Hewan yang digunakan dalam penelitian adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan, galur Sprague-Dawley, bobot 200-300

gram, usia berkisar 3-4 bulan, jumlah 35 ekor. Tikus diperoleh dari peternakan hewan uji IPB, Jawa Barat.

c. Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian, antara lain: CMC, alopurinol (Nanjing Pharma Chemical Plant) (Lampiran 3), kalium oksonat (Aldrich Chemical), eter (Merck), pereaksi Randox untuk penetapan kadar asam urat (Randox Laboratories), dan heparin.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: blender, *shaker*, *rotary evaporator*, *waterbath*, oven, timbangan analitik (Ohaus), timbangan hewan, sonde lambung, jarum suntik, pipet hematokrit (Marienfeld), *microtube*, spektrofotometer (Genesys 20), sentrifugator (Biofuge 13), pipet Eppendorf (Fortuna), dan alat-alat gelas lainnya.

C. Cara Kerja

1. Penyiapan Simplisia Uji

Daun gandarusa dipisahkan dari cabang dan ranting, kemudian dibersihkan dengan air mengalir, dikeringkan pada udara terbuka dan terlindung dari sinar matahari langsung. Pengeringan dilanjutkan di dalam

oven pada suhu 40-60°C selama 1 jam, kemudian diserbukkan menggunakan blender sehingga berukuran 30 mesh (12,26).

2. Pembuatan Ekstrak

Sebelum ekstrak dibuat, dilakukan uji pendahuluan untuk menentukan konsentrasi etanol yang memberikan rendemen paling besar, dengan konsentrasi etanol yang diuji adalah 20%, 40%, 60%, 70%, 80%, dan 96%. Hasil uji pendahuluan dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan uji pendahuluan, rendemen paling besar diberikan oleh etanol 60%, sehingga digunakan pada pembuatan ekstrak. Etanol 60% dibuat dengan cara mengencerkan etanol 96% yang telah didestilasi, dengan air suling. Untuk memastikan konsentrasi etanol yang telah dibuat, digunakan alkoholmeter.

Ekstrak dibuat dengan cara maserasi sebagai berikut: 200 g simplisia dimasukkan ke dalam sebuah bejana, kemudian dituangi dengan 1000 ml etanol 60%, dan ditutup. Campuran diaduk menggunakan *shaker* selama 1 jam. Pengadukan dilakukan sebanyak 3 kali dengan rentang waktu antar pengadukan adalah setengah jam. Setelah diaduk, campuran didiamkan selama 20 jam. Kemudian, campuran disaring dengan kertas saring. Maserasi dilakukan kembali terhadap ampas sebanyak 4 kali dengan langkah-langkah yang sama seperti di atas (27).

Jumlah pelarut pada maserasi ulangan berkurang dari maserasi sebelumnya. Pada maserasi pertama hingga kelima, jumlah pelarut berturut-turut adalah 1000 ml, 800 ml, 600 ml, 600 ml, dan 500 ml.

Filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada kisaran temperatur 40-60°C. Penguapan dilanjutkan menggunakan *waterbath* dengan kisaran temperatur yang sama sampai diperoleh ekstrak yang cukup kental. Penguapan dilanjutkan kembali menggunakan oven dengan kisaran temperatur yang sama pula, yaitu 40-60°C sehingga didapatkan ekstrak kental.

3. Deskripsi Organoleptik Ekstrak

Ekstrak etanol daun gandarusa diperiksa bentuk, rasa, warna, dan baunya.

4. Penetapan Parameter Ekstrak

a. Susut Pengeringan

Pengukuran susut pengeringan dilakukan dengan cara botol timbang bertutup dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit, didiamkan dalam desikator selama 10 menit, dan ditimbang. Ulangi tahapan tersebut hingga botol timbang bertutup tara. Kemudian, 1-2 gram ekstrak ditimbang saksama dalam botol timbang bertutup. Ekstrak dalam botol timbang diratakan dengan menggoyangkan botol.

Botol dimasukkan ke dalam oven, tutupnya dibuka, ekstrak dikeringkan pada suhu 105° C hingga bobot tetap (28).

b. Kadar Air

Pengukuran kadar air dilakukan dengan cara lebih kurang 10 gram ekstrak dimasukkan dan ditimbang saksama dalam wadah yang telah ditara. Ekstrak dikeringkan pada suhu 105° C selama 5 jam dan ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (28).

c. Kadar Abu

Pengukuran kadar abu dilakukan dengan cara lebih kurang 2-3 gram ekstrak yang telah digerus dan ditimbang saksama, dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian diratakan. Zat dipijar di dalam tanur pada temperatur 800°C hingga arang habis, kemudian didinginkan (5 menit di udara, kemudian 10 menit di dalam desikator) dan ditimbang. Ulangi proses tersebut hingga bobot tetap (28).

5. Penyiapan Hewan Uji

Sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji diaklimatisasi selama 2 minggu dalam kandang di Laboratorium Farmakologi Departemen

Farmasi FMIPA UI. Hewan uji yang sakit atau menunjukkan kelainan tidak diikutsertakan dalam percobaan.

6. Pembuatan CMC 0,5%

Untuk 1 hari perlakuan, diperlukan lebih kurang 200 ml CMC 0,5%. Sebanyak 1 g CMC ditaburkan ke permukaan 40 ml air suling hangat (20% dari volume total), kemudian didiamkan selama 15 menit hingga CMC mengembang. Campuran digerus hingga homogen, kemudian ditambahkan air suling sedikit demi sedikit sambil dihomogenkan, hingga 200 ml.

7. Sediaan Uji

a. Penetapan Dosis Sediaan Uji

Dosis daun gandarusa segar untuk rematik sendi pada manusia adalah 45 gram. Persentase bobot daun kering terhadap daun segar 23,41% dan besar rendemen ekstrak 27,13% (Tabel 1, Tabel 3). Faktor konversi dari manusia ke tikus, yaitu 0,018 dan faktor farmakodinamika adalah 10. Pada penelitian ini, dosis sediaan uji yang setara dosis manusia dijadikan sebagai dosis 2. Perhitungannya yaitu,

dosis 2: $0,018 \times 10 \times 45 \text{ g} \times 23,41\% \times 27,13\% = 0,52 \text{ g}/200 \text{ g bb}$,

sedangkan dosis 1 adalah setengah kali dosis 2 dan dosis 3 adalah 2 kali dosis 2 dengan perhitungan sebagai berikut:

- dosis 1: $\frac{1}{2} \times \text{dosis 2} = 0,26 \text{ g}/200 \text{ g bb}$,

- dosis 3: $2 \times \text{dosis 2} = 1,04 \text{ g}/200 \text{ g bb}$ (19).

b. Pembuatan Sediaan Uji

Langkah pertama untuk membuat kelompok sediaan uji adalah dengan membuat sediaan uji dosis terbesar (dosis 3). Dosis 2 dibuat dengan mengencerkan dosis 3, sedangkan dosis 1 dibuat dengan cara mengencerkan dosis 2. Pembuatan sediaan uji secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 4. Sediaan uji ini dibuat baru untuk tiap kali pemakaian.

8. Pembuatan Sediaan Alopurinol

Dosis lazim alopurinol adalah 200 mg sehari. Faktor konversi dari manusia ke tikus adalah 0,018 dan faktor farmakokinetik yang digunakan adalah 10. Dosis untuk tikus: $0,018 \times 10 \times 200 \text{ mg} = 36 \text{ mg}/200 \text{ g bb}$. Untuk volume pemberian sejumlah 3,0 ml/200 g bb, sebanyak 300,0 mg serbuk alopurinol ditimbang, kemudian disuspensikan dengan larutan CMC 0,5% sampai volume 25,0 ml sehingga didapatkan konsentrasi alopurinol 12 mg/ml. Volume 25,0 ml cukup untuk diberi pada 5 ekor hewan uji selama 1 hari perlakuan.

9. Pembuatan Sediaan Herbal "X"

Dosis lazim herbal "X" adalah 2 kapsul sehari. Tiap kapsul mengandung serbuk obat dengan berat 470 mg sehingga dosis total

herbal "X" untuk manusia adalah 940 mg. Faktor konversi dari manusia ke tikus adalah 0,018 dan faktor farmakokinetik yang digunakan adalah 10. Dosis untuk tikus: $0,018 \times 10 \times 940 \text{ mg} = 170 \text{ mg}/200 \text{ g bb}$. Untuk volume pemberian sejumlah 3,0 ml/200 g bb, sebanyak 1416,67 mg serbuk herbal "X" ditimbang, kemudian disuspensikan dengan larutan CMC 0,5% sampai volume 25,0 ml sehingga didapatkan konsentrasi 56,67 mg/ml. Volume 25,0 ml cukup untuk diberi pada 5 ekor hewan uji selama 1 hari perlakuan.

10. Pembuatan Sediaan Kalium Oksonat

Dosis kalium oksonat yang dapat membuat hiperurisemia hewan uji adalah 250 mg/kg bb. Maka didapatkan dosis untuk satu ekor tikus, yaitu 50 mg/200 g bb. Untuk volume pemberian sejumlah 0,6 ml/200 g bb, Sebanyak 1,25 gram kalium oksonat ditimbang, kemudian disuspensikan dengan larutan CMC 0,5% sampai volume 25,0 ml sehingga didapatkan konsentrasi kalium oksonat 50 mg/ml. Volume 25,0 ml cukup untuk diberi pada 30 ekor hewan uji selama perlakuan.

11. Perlakuan

Pada penelitian ini, berdasarkan rumus Federer: $(t-1)(n-1) \geq 15$, di mana t adalah jumlah hewan uji tiap kelompok dan n adalah jumlah ulangan dari tiap perlakuan, digunakan 35 ekor tikus yang dibagi secara acak dalam tujuh kelompok sehingga masing-masing kelompok terdiri dari

5 ekor tikus. Kelompok I, II, dan III adalah kelompok uji (kelompok yang diberikan sediaan uji pada dosis yang telah ditentukan); kelompok IV dan V adalah kelompok pembanding (kelompok yang diberikan alopurinol dan herbal "X"); kelompok VI adalah kelompok induksi; dan kelompok VII adalah kelompok normal.

Sediaan uji diberikan secara oral, sekali sehari, setiap hari, selama 8 hari pada kelompok uji, begitu juga dengan alopurinol dan herbal "X" pada kelompok pembanding. Kelompok induksi dan kelompok normal hanya diberi larutan CMC 0,5% secara oral, sekali sehari, setiap hari, selama 8 hari. Pemberian makan dan minum pada semua tikus tetap dilakukan seperti biasa.

Di hari ke-8, kalium oksonat diberikan secara i.p. (intraperitoneal) pada semua kelompok kecuali kelompok normal. Satu jam kemudian dilakukan pemberian bahan secara oral pada tikus. Dua jam setelah penginduksian kalium oksonat, darah tikus diambil. Gambaran perlakuan terhadap hewan uji dapat dilihat pada Tabel 4.

12. Cara Pengambilan Plasma Darah

Tikus terlebih dahulu dianestesi secara inhalasi menggunakan eter. Darah tikus diambil dari *sinus orbitalis* menggunakan pipet hematokrit (Gambar 8). Darah ditampung secara hati-hati ke dalam *microtube* yang telah diberi heparin, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan plasma. Plasma yang diperoleh,

disimpan pada suhu 2-8°C hingga dilakukan pengukuran kadar asam urat (10,23).

13. Penetapan Kadar Asam Urat dalam Plasma

Pada kuvet sampel, standar, dan blanko, dimasukkan 1000 µl pereaksi asam urat. Pada kuvet sampel dimasukkan plasma sebanyak 20 µl. Pada kuvet standar dimasukkan standar asam urat sebanyak 20 µl. Kedua campuran tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Pengukuran kadar asam urat dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Perlakuan untuk mengukur kadar asam urat dapat dilihat pada Tabel 5.

Besarnya kadar asam urat ditentukan dengan rumus:

Kadar asam urat = (serapan sampel : serapan standar) x 10 (mg/dl)

14. Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan uji homogenitas dan uji kenormalan. Jika data yang diperoleh bersifat homogen dan terdistribusi normal, dilakukan analisis varian satu arah (*one way Anova*) untuk melihat apakah ada perbedaan antar kelompok perlakuan. Bila terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan dan untuk mengetahui di mana perbedaannya, analisis dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) (10,29).