

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Karakterisasi Ekstrak

a. Rendemen

Hasil pengujian rendemen dari ekstrak kental mempunyai nilai rendemen 30%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6.

b. Karakteristik Ekstrak Spesifik

1) Identitas

Nama ekstrak : *Extractum Gendarussae folium*

Nama tanaman : *Justicia gendarussa* Burm. F.

Bagian tanaman : Daun

Nama Indonesia tanaman: Gandarusa

2) Organoleptik

Bentuk: cairan kental

Warna: coklat kehitaman

Bau : khas, agak manis

Rasa : agak pahit

3) Senyawa yang Terlarut dalam Pelarut Tertentu

Karakteristik senyawa terlarut dalam pelarut tertentu meliputi:

a) Kadar Senyawa yang Larut dalam Air

Hasil penetapan kadar senyawa yang larut dalam air sebesar 67,24%; 68,94%; dan 69,49%. Kadar senyawa larut air rata-rata adalah 68,56%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 7.

b) Kadar Senyawa yang Larut dalam Etanol

Hasil penetapan kadar senyawa yang larut dalam etanol sebesar 46,80%; 47,64%; dan 48,41%. Kadar senyawa larut etanol rata-rata adalah 47,62%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 8.

c. Karakteristik Ekstrak Non-spesifik

1) Susut Pengerinan

Hasil penetapan susut pengerinan sebesar 24,06%; 24,24%; dan 24,87%. Susut pengerinan rata-rata adalah 24,39%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 9.

2) Kadar Air

Hasil penetapan kadar air sebesar 22,31%; 22,62%; dan 22,77%. Kadar air rata-rata adalah 22,57%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 10.

3) Kadar Abu

a) Penetapan kadar abu total

Hasil penetapan kadar abu total sebesar 10,81%; 10,95%; dan 11,27%. Kadar abu rata-rata adalah 11,01%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 11.

b) Penetapan kadar abu yang tidak larut dalam asam

Hasil penetapan kadar abu yang tidak larut asam sebesar 3,46%; 3,82%; dan 4,87%. Kadar abu yang tidak larut asam rata-rata adalah 4,05%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 12.

d. Identifikasi Kandungan Kimia (Tabel 13)

1) Identifikasi alkaloid

Ekstrak memberikan hasil yang positif terhadap reaksi untuk alkaloid. Pada penambahan Mayer LP, terbentuk endapan kuning yang larut dalam metanol P. Hasil positif Bouchardat LP ditunjukkan dengan terbentuknya endapan coklat. Reaksi positif dengan Dragendorf LP membentuk endapan merah bata.

2) Glikosida

Ekstrak memberikan hasil yang negatif terhadap pengujian glikosida. Reaksi Lieberman-Burchard LP negatif karena tidak memberikan warna biru atau hijau melainkan coklat. Reaksi Molisch positif dengan terbentuknya cincin ungu. Reaksi Baljet negatif karena memberikan warna kuning bukan jingga. Reaksi Kedde negatif dengan

memberikan warna jingga bukan merah ungu. Reaksi Keller Killiani LP negatif karena tidak terbentuk cincin merah coklat. Identifikasi glikosida antrakinon memberikan warna kuning setelah ditarik dengan benzen, tetapi selanjutnya lapisan air tidak berwarna merah setelah penambahan natrium hidroksida.

3) Saponin

Ekstrak memberikan hasil yang positif terhadap saponin. Buih yang dihasilkan setinggi 2,2 cm setelah didiamkan selama 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan HCl 2N.

4) Flavonoid

Uji reduksi dengan Zn (Seng) memberikan warna merah muda sesaat setelah penambahan HCl_p. Hal ini menunjukkan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol). Uji reduksi dengan Mg (Magnesium) memberikan warna kuning jingga. Reaksi borat-oksalat memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan fluoresensi kuning pada sinar UV 366 nm melalui pembentukan kompleks asam borat-asam oksalat.

4) Tanin

Hasil uji identifikasi tanin memberikan hasil yang negatif. Larutan tidak memberikan endapan dengan pemberian natrium klorida-gelatin dan tidak membentuk larutan hijau atau biru kehitaman setelah pemberian besi (III) klorida melainkan kuning kecoklatan.

2. Penetapan Kadar Asam Urat

Tabel 3
Kadar asam urat rata-rata setiap kelompok perlakuan

Kelompok	Kadar asam urat (mg/dl) \pm SD
Kelompok I (dosis I)	1,71 \pm 0,40
Kelompok II (dosis II)	1,70 \pm 0,37
Kelompok III (dosis III)	1,33 \pm 0,34
Kelompok IV (pembanding alopurinol)	1,22 \pm 0,37
Kelompok V (pembanding herbal "X")	1,70 \pm 0,44
Kelompok VI (kontrol induksi)	3,67 \pm 0,32
Kelompok VII (kontrol normal)	1,22 \pm 0,38

Grafik dan hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 21 dan Tabel 14.

3. Efektivitas Penurunan Kadar Asam Urat

Tabel 4
Efektivitas penurunan kadar asam urat rata-rata
kelompok dosis dan pembanding

Kelompok	Efektivitas (%)
Kelompok I (dosis I)	80,00
Kelompok II (dosis II)	80,41
Kelompok III (dosis III)	95,51
Kelompok IV (pembanding alopurinol)	100,00
Kelompok V (pembanding herbal "X")	80,41

Grafik dan contoh perhitungan efektivitas dapat dilihat pada Gambar 22 dan Lampiran 4.

4. Data Kadar Asam Urat

Hasil pengujian homogenitas (Levene) dan kenormalan (Saphiro-Wilk) dengan $\alpha = 0,05$ data kadar asam urat setiap kelompok menunjukkan variasi yang homogen (Lampiran 5) dan terdistribusi secara normal (Lampiran 6).

Hasil uji analisis varian satu arah (ANAVA) dengan $\alpha = 0,05$ terhadap data kadar asam urat setiap kelompok menunjukkan perbedaan yang bermakna (Lampiran 7).

Hasil uji beda nyata terkecil (BNT) dengan $\alpha = 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok I,II,II (kelompok dosis), IV (alopurinol), V (herbal "X"), dan VII (kontrol normal) dengan kelompok VI (kontrol induksi) (Lampiran 8)

Hasil BNT menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna antara kelompok II (dosis II), III (dosis III), IV (alopurinol) dan V (herbal "X") dengan kelompok VII (kontrol normal) tetapi ada perbedaan bermakna dengan kelompok I (dosis I) (Lampiran 8).

Hasil BNT menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna antar kelompok dosis yaitu kelompok I (dosis I), kelompok II (dosis II) dan kelompok III (dosis III) (Lampiran 8).

Hasil BNT menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna antara kelompok II (dosis II) dan III (dosis III) dengan kelompok IV (alopurinol) tetapi ada perbedaan bermakna dengan kelompok I (dosis I) (Lampiran 8).

Hasil BNT menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna antara kelompok I (dosis I), II (dosis II) dan III (dosis III) dengan kelompok V (herbal "X") (Lampiran 8).

B. PEMBAHASAN

Penelitian "Karakterisasi ekstrak air daun gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm. F.) dan pengaruhnya terhadap kadar asam urat

plasma tikus putih jantan yang diinduksi kalium oksonat” bertujuan untuk mengetahui adanya penurunan kadar asam urat plasma darah tikus putih jantan yang telah dibuat hiperurisemia dengan induksi kalium oksonat. Penelitian ini penting untuk membuktikan pengalaman empiris masyarakat secara ilmiah dengan eksperimen di laboratorium.

Karakterisasi ekstrak perlu dilakukan untuk menilai kualitas ekstrak yang digunakan sehingga dilakukan karakterisasi ekstrak mulai dari karakteristik ekstrak spesifik dan non-spesifik.

Tanaman asal yang digunakan adalah *Justicia gendarussa* Burm. F. dewasa berumur kurang lebih 9 bulan yang telah di determinasi oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) agar kebenaran tanaman dapat dipertanggungjawabkan (Lampiran 9). Tanaman gandarusa yang digunakan merupakan tanaman budidaya sehingga keseragaman umur, masa panen, dan galur tanaman dapat dipantau. Bagian tanaman yang diambil adalah daun. Pemetikan daun yaitu yang terletak pada ruas ke-3 sampai ke-8. Keseragaman umur dan letak daun yang digunakan penting untuk menjamin keseragaman kandungan kimia dari tanaman tersebut (31).

Daun segar yang diperoleh dilakukan sortasi basah terhadap tanah dan kerikil, rumput-rumputan, bahan tanaman lain atau bagian lain dari tanaman yang tidak digunakan, serta bagian tanaman yang rusak. Setelah itu dilakukan pencucian daun dengan air yang mengalir untuk menghilangkan kotoran fisik yang melekat seperti debu, tanah,

dan bahan yang tercemar pestisida. Daun bersih dipotong-potong untuk memperluas permukaannya agar lebih mudah mengering. Proses selanjutnya adalah pengeringan dengan cara diangin-anginkan pada udara terbuka yang terlindung dari sinar matahari langsung selama tujuh hari. Tujuan pengeringan adalah untuk menurunkan kadar air yang terdapat dalam daun agar tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri, menghilangkan aktifitas enzim yang dapat menguraikan lebih lanjut kandungan zat aktif, serta untuk memudahkan dalam pengelolaan selanjutnya (31). Pengeringan dilanjutkan dalam oven bersuhu 40-60⁰ C selama 1 jam, suhu yang digunakan tidak terlalu tinggi yang berguna untuk mencegah perusakan senyawa-senyawa yang tidak tahan dengan pemanasan tinggi . Daun kering selanjutnya diserbuk hingga halus dengan blender dan diayak dengan ayakan 30 mesh. Pembuatan serbuk ini bertujuan untuk memperluas permukaan yang akan bersentuhan dengan cairan penyari pada proses ekstraksi (20).

Serbuk daun gandarusa tersebut selanjutnya disebut sebagai simplisia gandarusa. Secara empirik, masyarakat menggunakan daun gandarusa dengan cara merebus dengan air kemudian disaring dan filtratnya diminum untuk mengobati penyakit rematik sendi (4,5). Untuk itu, pada penelitian ini digunakan cara dan pelarut yang sama yang dipakai di masyarakat, namun penelitian ini menginginkan proses yang sempurna dengan mengulang rebusan beberapa kali.

Serbuk simplisia direbus menggunakan panci infus dengan pelarut aquades. Cara ekstraksi demikian dinamakan infundasi. Sebelum dilakukan ekstraksi, serbuk simplisia sebanyak 100 g dibasahi terlebih dahulu dengan aquades 200 ml. Tujuan pembasahan ini adalah untuk memberikan kesempatan yang sebesar-besarnya kepada cairan penyari memasuki seluruh pori-pori dalam simplisia dengan mengganti udara dalam pori-pori dengan cairan penyari agar mempermudah proses penyarian selanjutnya. Setelah itu, ditambahkan pelarut aquades sebanyak 1000 ml dan dilakukan perebusan selama 15 menit sejak mencapai suhu 90⁰ C. Proses ini diulangi sebanyak empat kali agar proses ekstraksi dapat berlangsung secara sempurna dimana semua zat kimia yang dapat tertarik terekstraksi seluruhnya. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh filtrat yang masih dapat mengalir. Selanjutnya, filtrat diuapkan dalam cawan penguap di *water bath* dengan suhu tidak lebih dari 50⁰ C sampai diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dibandingkan bobotnya dengan simplisia awal yang digunakan. Perbandingan dalam persen menyatakan nilai rendemen dari ekstrak tersebut. Nilai rendemen ekstrak adalah 30%. Besar kecilnya nilai rendemen menunjukkan keefektifan proses ekstraksi. Efektivitas proses ekstraksi

dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan sebagai penyari, ukuran partikel simplisia, metode dan lamanya ekstraksi.

Ektrak kental yang diperoleh dilakukan pengujian karakterisasi terlebih dahulu yang meliputi karakteristik ekstrak spesifik dan non-spesifik. Karakteristik ekstrak spesifik meliputi identitas, organoleptik, dan senyawa terlarut dalam pelarut tertentu yaitu air dan etanol. Karakteristik ekstrak non-spesifik meliputi susut pengeringan, kadar air, dan kadar abu. Selain itu, juga dilakukan identifikasi kandungan kimia.

Identitas ekstrak yang diperoleh memiliki nama *Extractum Gendarussae folium* yang diambil dari daun tanaman *Justicia gendarussa* Burm. F. atau nama Indonesiannya gandarusa. Untuk pengenalan awal yang sederhana dan seobyektif mungkin dilakukan pengujian organoleptik melalui deskripsi pancaindera yaitu ekstrak air daun gandarusa berbentuk kental yang berwarna coklat kehitaman dengan rasa agak pahit dan bau manis yang spesifik.

Kadar senyawa yang larut dalam air lebih besar dibanding kadar senyawa yang larut dalam etanol yaitu berturut-turut 68,56% dan 47,62%. Hal ini dikarenakan pada proses ekstraksi digunakan pelarut air sehingga senyawa yang terekstraksi lebih banyak yang terlarut dalam air.

Susut pengeringan ekstrak adalah 24,39%. Nilai ini menyatakan jumlah maksimal senyawa yang mudah menguap atau hilang pada proses pengeringan. Nilai susut pengeringan dalam hal khusus identik

dengan kadar air jika bahan tidak mengandung minyak atsiri dan sisa pelarut organik yang menguap. Kadar air ekstrak adalah 22,57%, nilai ini menyatakan jumlah minimal kandungan air dalam bahan karena berada di atmosfer atau lingkungan udara terbuka.

Penilaian kadar air pada penelitian ini menggunakan cara gravimetri yaitu dengan penimbangan sampai bobot tetap. Nilai susut pengeringan ekstrak lebih besar dibanding kadar air yang menyatakan dalam ekstrak selain terdapat air yang dapat menguap kemungkinan juga terdapat senyawa lain yang mudah menguap seperti minyak atsiri (22).

Pemeriksaan kadar abu menggunakan prinsip memanaskan bahan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, sehingga hanya tertinggal unsur mineral dan anorganik. Tujuan penetapan kadar abu adalah untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak (22). Kadar abu total ekstrak adalah sebesar 11,01% dan kadar abu tidak larut asam sebesar 4,05%. Tingginya kadar abu dalam ekstrak karena tanaman gandarusa memiliki kandungan kalsium dan kalium yang tinggi (4,5,8).

Pada identifikasi kandungan kimia, ekstrak memiliki kandungan kimia yaitu alkaloid, flavonoid dan saponin.

Pada identifikasi alkaloid, penambahan asam klorida dimaksudkan untuk meningkatkan kelarutan alkaloid, karena alkaloid

akan bereaksi dengan asam kuat membentuk garam yang mudah larut air. Selanjutnya, pembentukan endapan kuning dengan Mayer dan endapan merah bata dengan Dragendorf terjadi karena terbentuknya senyawa adisi yang tidak larut, sementara endapan coklat dengan Bouchardat yang terjadi adalah karena pembentukan senyawa kompleks bebas yang kemudian mengendap (23).

Pada identifikasi flavonoid, reduksi dengan Zn menimbulkan warna merah muda dan reduksi dengan Mg menimbulkan warna kuning jingga. Sementara itu, pada reaksi borat-oksalat, fluoresensi kuning terjadi akibat pembentukan kompleks oksalo-borat yang dapat memberikan serapan pada daerah UV 366 nm.

Pada identifikasi saponin terbentuk buih karena sifat dasar saponin yang membentuk larutan koloidal dalam air dan membentuk busa ketika pengocokan.

Reaksi molisch positif pada ekstrak ini karena adanya gugus gula dalam ekstrak yang kemungkinan berasal dari flavonoid (glikosida-3-flavonol). Pada reaksi ini terbentuk furfural akibat dehidrasi karena adanya asam sulfat pekat, furfural ini akan membentuk senyawa yang berwarna ungu apabila direaksikan dengan α naftol karena terjadi reaksi kondensasi (32).

Setelah dilakukan karakterisasi ekstrak maka kualitas ekstrak dapat dinilai. Untuk itu, dapat dilakukan uji khasiat untuk melihat efektivitas ekstrak sebagai penurun kadar asam urat.

Pengujian efektivitas ekstrak dalam penurunan kadar asam urat dilakukan dengan menggunakan hewan uji. Hal ini dilakukan untuk keamanan dan mencegah hal-hal yang tidak diinginkan apabila langsung diujikan pada manusia. Hewan uji yang biasa digunakan dalam penelitian di laboratorium adalah tikus, mencit, babi, kelinci, hamster, kucing, anjing, monyet dan katak (28).

Pada penelitian ini digunakan tikus (*Rattus novergicus*) sebagai hewan uji karena kemudahan hewan ini untuk bereproduksi sehingga sumber daya alam hayati hewan tersebut dapat terus dijaga, ukuran tubuhnya kecil sehingga mudah ditangani, memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap obat, dapat diperoleh dalam galur murni, sifatnya tenang, dan tidak terlalu fotofobik (28). Penggunaan hewan uji tikus juga memudahkan untuk melanjutkan penelitian ke arah jenjang uji keamanan ekstrak yaitu uji toksisitas akut, sub-kronik, dan kronik.

Tikus yang digunakan dalam penelitian ini harus memiliki spesifikasi yang sama sehingga variasi individu dapat diminimalisir. Tikus tersebut harus berasal dari galur, umur, jenis kelamin, berat badan, kondisi lingkungan, dan makanan yang sama. Pada penelitian ini digunakan tikus putih karena cenderung aktif pada malam hari, sedangkan pada siang hari digunakan untuk beristirahat sehingga pada siang hari tikus putih mudah ditangani. Tikus putih yang digunakan adalah galur Sprague-Dawley (Lampiran 10). Jenis kelamin hewan uji yang digunakan adalah berkelamin jantan untuk

menghindari pengaruh hormonal karena tikus jantan memiliki aktifitas hormonal yang lebih stabil dibandingkan tikus betina. Pada manusia sendiri, kadar asam urat pada wanita lebih rendah daripada pria karena salah satunya pengaruh dari estrogen (1).

Sebelum dilakukan percobaan, semua tikus diaklimatisasi terlebih dahulu. Tujuan dari aklimatisasi ini adalah untuk membiasakan tikus dengan lingkungan baru agar tidak muncul stress. Aklimatisasi dilakukan selama 2 minggu, dalam kurun waktu tersebut tikus diberi makan dan minum serta dikontrol kesehatannya. Tikus yang tidak sehat atau menunjukkan adanya kelainan seperti mata tidak bersinar, diare, berat badan menurun, bulu berdiri, dan berwarna kusam tidak diikutsertakan dalam percobaan. Keadaan sakit atau kelainan ini dapat mempengaruhi metabolisme obat dalam tubuh tikus sehingga akan mengganggu pengamatan kadar asam urat.

Tikus dibagi menjadi tujuh kelompok dengan anggota lima ekor per kelompok. Pembagian kelompok ini menggunakan sistem Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu pembagian kelompok dimana tidak ada lagi sumber keragaman selain pengaruh perlakuan yang diketahui atau diantisipasi. Cara pengelompokan tikus dilakukan dengan metode undian yaitu semua tikus diberi nomor dan diundi satu per satu sambil dikelompokkan di dalam kandang sesuai dengan jumlah tikus per kelompoknya. Tujuan pembagian secara acak ini

adalah agar setiap kelompok dapat mewakili populasi tikus yang besar.

Penelitian ini menggunakan tiga puluh lima ekor tikus yang dibagi dalam tujuh kelompok. Kelompok I, II, dan III adalah kelompok dosis sediaan uji ekstrak air daun gandarusa yaitu dosis I, II, dan III. Penggunaan variasi dosis ditujukan untuk melihat pengaruh perbedaan dosis dengan efek menurunkan kadar asam uratnya. Dosis yang digunakan adalah dosis $\frac{1}{2}$ kali (dosis I), dosis 1 kali (dosis II), dan dosis 2 kali (dosis III) dari penggunaan secara empiris di masyarakat. Dosis yang biasa digunakan secara empiris adalah 30-60 gram daun segar (5). Penelitian ini mengambil nilai dosis sebesar 45 gram daun segar dan karena menggunakan daun kering maka perlu dikonversi sebesar 28,37% karena kehilangan air setelah proses pengeringan. Maka dosis 1 kali yang digunakan adalah 12,77 gram daun kering atau simplisia daun gandarusa (Lampiran 1). Bahan uji yang digunakan berupa ekstrak, oleh karena itu dosis daun kering harus dikalikan dengan rendemen sebesar 30%. Maka dosis 1 kali yang digunakan adalah 3,84 gram ekstrak kental (Lampiran 2).

Dosis untuk hewan uji harus disesuaikan dari dosis untuk manusia. Apabila digunakan tikus, maka terdapat nilai faktor konversi dari manusia ke tikus sebesar 0,018. Faktor konversi ini dipengaruhi dari ukuran tubuh antara manusia dan tikus. Selain itu, terdapat faktor farmakokinetik sebesar 10 karena dipengaruhi perbedaan kecepatan

metabolisme tikus dan manusia, dimana kecepatan metabolisme tikus lebih cepat 10 kali dibandingkan manusia. Maka diperoleh dosis untuk tikus adalah dosis manusia x faktor konversi x faktor farmakokinetik. Dosis 1 kali (dosis II) tikus adalah: $3,84 \text{ gram ekstrak} \times 0,018 \times 10 = 0,69 \text{ g/200 g bb ekstrak}$. Dosis $\frac{1}{2}$ kalinya (dosis I) yaitu $0,345 \text{ g/200 g bb ekstrak}$ sedangkan dosis 2 kalinya (dosis III) yaitu $1,38 \text{ g ekstrak/200 g bb tikus}$ (Lampiran 2).

Kelompok IV adalah kelompok pembanding alopurinol. Alopurinol yang digunakan adalah berupa bahan baku yang diperoleh dari industri farmasi (Lampiran 11). Digunakan alopurinol sebagai pembanding karena alopurinol adalah obat modern yang umum digunakan untuk menurunkan kadar asam urat. Selain itu, ingin diketahui apakah mekanisme kerja ekstrak air daun gandarusa sama atau tidak dengan alopurinol yaitu dengan menghambat pembentukan asam urat melalui hambatan xanthin oksidase, karena dalam ekstrak mengandung senyawa flavonoid yang dalam beberapa penelitian dapat menghambat xanthin oksidase (33,34,35). Penghambatan terhadap kerja enzim tersebut dapat mencegah pembentukan hipoxantin menjadi xantin dan pembentukan xantin menjadi asam urat. Dosis alopurinol yang digunakan adalah 200 mg untuk manusia. Dosis untuk tikus setara dengan 36 mg/200 g bb .

Kelompok V adalah kelompok pembanding herbal "X". Digunakan pembanding herbal selain pembanding alopurinol adalah

untuk mengurangi kesenjangan ekstrak yang diujikan yang merupakan obat bahan alam dengan alopurinol yang merupakan obat modern. Selain itu, ingin diketahui pula perbandingan efektivitas penurunan kadar asam urat ekstrak terhadap alopurinol dan herbal. Herbal yang digunakan adalah jamu herbal "X" yang dipilih karena telah dipasarkan secara luas di Indonesia. Dosis herbal "X" untuk manusia adalah 2 kapsul sehari yang setara dengan 940 mg sehari. Dosis untuk tikus setara dengan 170 mg/200 g bb.

Kelompok VI adalah kelompok kontrol induksi. Kelompok ini diberi sediaan uji berupa suspensi Na-CMC 0,5% dan merupakan kelompok yang memberikan gambaran kadar asam urat tertinggi ketika diinduksi. Kelompok VII adalah kelompok kontrol normal. Kelompok ini diberi sediaan uji berupa suspensi Na-CMC 0,5% dan merupakan kelompok yang memberikan gambaran kadar asam urat normal pada tikus tanpa diinduksi.

Sediaan uji dari masing-masing kelompok diberikan secara oral ke tikus dengan menggunakan sonde lambung, karena semua sediaan uji biasa diberikan secara oral pada manusia. Untuk mengurangi variasi individu tikus maka volume pemberian sediaan uji setiap kelompok sama yaitu 3 ml/200 g bb. Sediaan uji masing-masing disuspensikan dalam Na-CMC 0,5% sesuai dengan konsentrasi yang dikehendaki (Lampiran 2). Sebelum diberikan sediaan uji secara oral,

semua tikus dipuasakan selama 2 jam terlebih dahulu untuk menghindari pengaruh makanan terhadap sediaan uji.

Semua kelompok diperlakukan selama 8 hari dengan memberikan masing-masing sediaan ujinya satu kali dalam sehari. Perlakuan selama 8 hari ini dilakukan untuk meningkatkan akumulasi pengaruh penurunan kadar asam urat sediaan uji. Penurunan kadar asam urat mencapai normal diharapkan terjadi dalam waktu singkat mengingat pengobatan gout harus berlangsung cepat untuk menghilangkan ketidaknyamanan penderita. Pada penelitian lain, pengujian penurunan kadar asam urat suatu ekstrak tanaman dapat dilakukan setelah 3 hari pemberian sediaan uji (35). Pada hari ke-8, semua kelompok diinduksi dengan kalium oksonat secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg/200 g bb tikus kecuali kelompok VII (kontrol normal) diberi Na-CMC 0,5% secara intraperitoneal.

Kalium oksonat merupakan inhibitor urikase yang poten dan memiliki waktu bersihan yang singkat sehingga dapat membuat tikus memiliki kadar asam urat yang tinggi dalam waktu singkat. Urikase berperan sebagai katalis untuk mengoksidasi asam urat menjadi allantoin pada tikus. Penghambatan kompetitif kerja enzim ini mengakibatkan akumulasi asam urat pada tikus. Satu jam setelah diinduksi, semua kelompok diberikan sediaan uji terakhir dan satu jam kemudian semua kelompok diambil darahnya melalui sinus orbital mata. Pengambilan darah dengan cara ini dipilih karena prosedurnya

cepat, volume darah cukup besar dan lancer, tidak membuat hewan uji menjadi stress, sehingga mengurangi resiko terjadinya lisis (36). Pengambilan darah dilakukan dua jam setelah induksi kalium oksonat karena berdasarkan penelitian terdahulu kadar asam urat pada waktu tersebut mencapai kadar tertinggi, kemudian kadar asam urat akan menurun dan mencapai normal dalam waktu 24 jam (19).

Sebelum pengambilan darah, tikus dianestesi eter terlebih dahulu untuk menghilangkan kesadarannya. Eter dipilih karena mudah dalam pemakaiannya yaitu cukup dengan cara inhalasi, mula kerja cepat, dan lama kerja cukup cepat sehingga tikus dapat segera sadar setelah proses pengambilan darah selesai. Selanjutnya, melalui memutar pipet hematokrit yang ditusukkan pada sinus orbital matanya, darah dikumpulkan ke dalam mikrotube yang telah diberi heparin untuk mencegah pembekuan darah. Darah yang diperoleh, disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 5 menit untuk memisahkan plasmanya. Berdasarkan berat jenisnya, maka, plasma akan terletak di atas sel-sel darahnya. Plasma yang diperoleh dipisahkan dan digunakan untuk pengukuran kadar asam urat.

Pengukuran kadar asam urat dilakukan dengan metode kolorimetri-enzimatis. Peneliti menggunakan pereaksi kit untuk asam urat (Randox) yang mengandung urikase dan peroksidase. Metode ini dipilih karena metode ini memberikan cara sederhana untuk menentukan kadar asam urat cairan biologis serta merupakan metode

yang selektif dan spesifik. Dengan metode ini, hanya asam urat saja yang akan dioksidasi menjadi alantoin karena menggunakan urikase. Asam urat dapat diukur menggunakan spektrofotometer karena hasil oksidasi asam urat dengan adanya urikase dapat membentuk hidrogen peroksida yang akan bereaksi dengan di-kloro-hidroksibenzensulfonat (DCHBS) dan p-aminofenazon (PAP) membentuk senyawa yang mempunyai gugus kromofor yaitu quinonimin (N-(4-antipiril)-3-kloro-5-sulfonat-p-benzokuinonimuin) yang dikatalisis oleh peroksidase (15).

Sampel plasma yang mengandung asam urat direaksikan dengan peraksi asam urat, dicampur dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 25⁰ C. Inkubasi ini bertujuan untuk memperoleh serapan yang optimum dan stabil dari quinonimin yang telah terbentuk sempurna. Warna senyawa yang terbentuk adalah merah ungu yang selanjutnya diukur secara spektro-kolorimetri pada panjang gelombang 520 nm. Panjang gelombang yang digunakan bukan panjang gelombang maksimumnya untuk menghindari interferensi dari hemolisis, hemoglobin dan reaksi turbidimetri karena panjang gelombang maksimumnya ada pada 512 nm. Warna senyawa ini stabil dengan tidak ada perubahan serapan yang berarti selama 30 menit setelah inkubasi (14,15).

Kadar asam urat setiap kelompok perlakuan ditentukan dengan perbandingan serapan sampel dan serapan standarnya. Standar asam

urat diperlakukan sama seperti pada sampel plasma, standar ini memiliki kadar sebesar 10 mg/dl pada 20 µl. Kadar asam urat tertinggi ditunjukkan oleh kelompok kontrol induksi (kelompok VI) yaitu sebesar 3,67 mg/dl dan kadar asam urat terendah ditunjukkan oleh kelompok kontrol normal (kelompok VII) dan kelompok pembanding alopurinol (kelompok IV) yaitu sebesar 1,22 mg/dl. Kadar asam urat kelompok I, II, III (dosis I, II, III) dan kelompok V (pembanding herbal "X") berturut-turut adalah 1,71 mg/dl; 1,70 mg/dl; 1,33 mg/dl ; dan 1,70 mg/dl. Kadar asam urat normal pada tikus adalah sebesar 0,5-1,4 mg/dl dan kadar asam urat pada tikus yang hiperurisemia karena induksi kalium oksonat adalah sebesar 1,7-3,0 mg/dl (37).

Kadar asam urat pada kelompok I (dosis I) dan kelompok II (dosis II) tidak mengalami perbedaan signifikan walaupun dosis tersebut berbeda 2 kalinya. Hal ini dikarenakan dosis yang dipakai pada dosis I adalah 22,5 gram daun segar dan pada dosis II yaitu 45 gram daun segar. Jika dihubungkan dengan pemakaian pada masyarakat yaitu sebesar 30-60 gram daun segar, dosis I (22,5 gram daun segar) hampir setara dengan dosis 30 gram daun segar dan dosis II (45 gram daun segar) masih terdapat dalam range dosis 30-60 gram daun segar sehingga bisa disimpulkan dosis I dan II adalah dosis yang biasa digunakan dalam masyarakat yang ketika dibuktikan secara laboratorium tidak memiliki perbedaan bermakna. Dosis III adalah dosis 90 gram daun segar, dosis ini jauh di atas dosis yang

biasa digunakan di masyarakat, sehingga efektivitas penurunan kadar asam urat lebih besar dari dosis I dan dosis II.

Kadar asam urat rata-rata setiap kelompok dosis dan perbandingan dibandingkan dengan kadar asam urat rata-rata kelompok kontrol induksi dan normal. Hasil perbandingan itu dinyatakan dalam efektivitas penurunan kadar asam urat.

Berdasarkan data efektivitas penurunan kadar asam urat rata-rata yang diperoleh dari setiap kelompok terlihat bahwa alopurinol memiliki kemampuan menurunkan kadar asam urat yang paling besar yaitu 100%. Efektivitas kedua dimiliki oleh kelompok III (dosis III) yaitu 95,51%. Efektivitas kelompok I (dosis I) adalah 80,00%, kelompok II (dosis II) adalah 80,41%, dan kelompok V (herbal "X") adalah 80,41%.

Peningkatan efektivitas terlihat dalam kelompok dosis dimana kelompok III (dosis III) memiliki efektivitas yang paling tinggi dan hampir setara dengan alopurinol. Peningkatan efektivitas disebabkan oleh makin tingginya jumlah dosis yang diberikan. Peningkatan dosis yang lebih tinggi dari dosis III juga dilakukan, namun tidak terdapat peningkatan efektivitas yang lebih tinggi lagi karena sediaan uji tidak bisa diabsorpsi dengan baik oleh hewan uji.

Data kadar asam urat dari semua kelompok sediaan uji menunjukkan adanya penurunan kadar asam urat setelah diinduksi. Data kadar asam urat yang diperoleh diuji homogenitas menurut Levene dan kenormalan menurut Saphiro-Wilk. Analisis data

menunjukkan data kadar asam urat setiap kelompok memiliki variasi yang homogen dan terdistribusi secara normal. Untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan maka dilakukan uji analisis varian satu arah (ANAVA) (28).

Hasil uji ANAVA menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($\alpha = 0,05$) antar kelompok perlakuan maka untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara bermakna dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT) (30).

Hasil uji beda nyata terkecil (BNT) menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($\alpha = 0,05$) antara kelompok I, II, dan III (kelompok dosis), IV (alopurinol), V (herbal "X"), dan VII (kontrol normal) dengan kelompok VI (kontrol induksi). Hal ini menunjukkan adanya penurunan kadar asam urat yang bermakna oleh semua kelompok dosis dan kelompok pembanding (alopurinol dan herbal "X").

Hasil BNT menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna antara kelompok II (dosis II), III (dosis III), IV (alopurinol), dan V (herbal) dengan kelompok VII (kontrol normal). Hal ini menunjukkan bahwa penurunan kadar asam urat yang terjadi setara dengan kadar asam urat normal.

Perbedaan bermakna hasil BNT ditunjukkan antara kelompok I (dosis I) dengan kelompok VII (kontrol normal). Hal ini menunjukkan bahwa penurunan kadar asam urat yang terjadi tidak setara dengan kadar asam urat normal.

Tidak ada perbedaan bermakna hasil BNT ditunjukkan antara kelompok dosis (kelompok I, II, dan III). Hal ini menunjukkan bahwa penurunan kadar asam urat yang terjadi oleh masing-masing kelompok dosis adalah setara.

Hasil BNT menunjukkan tidak adanya perbedaan antara kelompok dosis dengan pembanding alopurinol kecuali kelompok I. Hal ini menunjukkan bahwa penurunan kadar asam urat yang terjadi pada kelompok II dan III setara dengan alopurinol dan penurunan kadar asam urat yang terjadi pada kelompok I tidak setara dengan alopurinol .

Hasil BNT menunjukkan tidak adanya perbedaan antara kelompok dosis (Kelompok I, II, dan III) dengan pembanding herbal "X". Hal ini menunjukkan bahwa penurunan kadar asam urat yang terjadi pada kelompok dosis setara dengan herbal "X".

Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) adalah uji yang membandingkan ada atau tidaknya perbedaan bermakna antara satu kelompok dengan kelompok lain dimana semua kelompok dinyatakan berbeda bermakna secara ANAVA. Penilaian berbeda atau tidaknya satu kelompok dengan kelompok lain terlepas dari pengaruh kelompok yang tidak diikutsertakan. Jadi, meskipun hasil BNT yang membandingkan antar kelompok dosis tidak berbeda bermakna tetapi apabila masing-masing kelompok dosis dibandingkan dengan kelompok lain dapat menunjukkan hasil yang berbeda. Suatu kelompok dinyatakan

berbeda bermakna dengan kelompok lain jika nilai signifikansinya kurang dari 0,05 ($<0,05$) dan dinyatakan tidak berbeda bermakna jika nilai signifikansinya lebih dari atau sama dengan 0,05 ($\geq 0,05$).

Pengujian data dengan menggunakan statistik ini memiliki kelemahan yaitu hasil pengolahan datanya dapat menyatakan hal yang cukup berbeda dengan nilai secara kasat mata. Hal ini terlihat dari data kadar asam urat kelompok I (1,71 mg/dl) yang dinyatakan berbeda bermakna dengan kelompok VII, meskipun data kadar asam urat kelompok II (1,70 mg/dl) dan kelompok V (1,70 mg/dl) dinyatakan tidak berbeda bermakna dengan kelompok VII, yang dinilai secara kasat mata data dari kelompok I, II, dan V tidak berbeda bermakna.