

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Farmakologi Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok, selama lebih kurang 4 bulan sejak bulan Januari sampai Mei 2008.

B. BAHAN

1. Bahan Uji

Penelitian ini menggunakan bahan uji berupa daun tanaman Gandarusa ruas ke-3 sampai ke-8 (*Justicia gendarussa* Burm. F.) berumur 9 bulan yang diperoleh di kebun sekitar Departemen Farmasi FMIPA UI Depok dan telah dideterminasi oleh Pusat Penelitian dan Pengembangan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor. Bahan uji pembanding yang digunakan adalah alopurinol (Nanjing Pharma) dan jamu herbal "X" (Indofarma).

2. Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur Sprague-Dawley berumur 3-4 bulan dengan bobot antara 250-300 gram sejumlah 35 ekor yang diperoleh dari Bagian Non-Ruminansia dan Satwa Harapan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

3. Bahan Kimia

Penelitian ini menggunakan bahan kimia untuk perlakuan hewan uji yaitu pereaksi asam urat (Randox), kalium oksonat (Sigma Aldrich Chemical), eter (Merck), Na-karboksimetilselulosa (Merck), dan heparin (Invicol). Bahan kimia yang digunakan untuk penetapan karakteristik ekstrak yaitu kloroform (Merck), etanol 96% (Merck), asam sulfat (Merck), asam klorida (Merck), natrium sulfat anhidrat (Merck), metanol (Merck), kalium hidroksida (Merck), besi (III) klorida (Merck), asam asetat anhidrat (Merck), benzen (Merck), natrium hidroksida (Merck), serbuk seng (Merck), serbuk magnesium (Merck), asam borat (Merck), asam oksalat (Merck), natrium klorida (Merck), dan gelatin (Merck).

C. ALAT

Penelitian ini menggunakan alat yaitu spektrofotometer UV-VIS (*Genesys*), sentrifugator Biofuge 13 (*Heraeus Sepatech*), timbangan hewan (*Mettler Toledo*), timbangan analitik (*Mettler Toledo*), pipet hematokrit (*Marienfield*), pipet Ependorf (*Socorex*), dan alat-alat gelas (*Iwaki Pyrex*).

D. CARA KERJA

1. Penyiapan Bahan Uji

a. Pembuatan Simplisia

Daun segar gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm. F.) yang diperoleh dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan cemaran fisik yang melekat dan dikeringkan di udara terbuka yang terlindung dari sinar matahari langsung selama lebih kurang tujuh hari. Pengeringan dilanjutkan dalam oven pada suhu 40-60⁰ C selama satu jam. Selanjutnya daun kering diserbuk hingga halus dengan blender dan diayak dengan ukuran 30 mesh (Gambar 12 dan 13).

b. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara infundasi. Serbuk simplisia ditimbang sejumlah 100 g dibasahi dengan aquades 200 ml dan direbus dengan menggunakan aquades 1000 ml dalam panci infus selama 15 menit terhitung setelah mencapai suhu 90°C , sambil sesekali diaduk, kemudian filtrat disaring setelah dingin menggunakan kain flanel (20,21). Ampas direbus kembali dengan cara dan menggunakan jumlah pelarut yang sama sebanyak empat kali rebusan.

Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 70°C sampai diperoleh cairan yang masih dapat mengalir kemudian diuapkan menggunakan *water bath* dalam cawan penguap dengan suhu tidak lebih dari 50°C hingga diperoleh ekstrak kental (Gambar 14).

2. Karakterisasi Ekstrak

a. Rendemen (22)

Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dibandingkan bobotnya dengan serbuk simplisia awal yang digunakan. Perbandingan tersebut dinyatakan dalam persen (%).

b. Karakteristik Ekstrak Spesifik (22)

1) Identitas

Ekstrak yang diperoleh memiliki identitas yang mendeskripsikan tata nama yang meliputi nama ekstrak, nama latin tanaman (sistematika botani), bagian tanaman yang digunakan, dan nama Indonesia tanaman.

2) Organoleptik

Ekstrak yang diperoleh diuji secara organoleptik menggunakan pengamatan panca indera yang menyatakan bentuk, warna, rasa, dan bau dari ekstrak.

3) Senyawa yang Terlarut dalam Pelarut Tertentu

a) Kadar Senyawa yang Larut dalam Air

Sejumlah 5,0 gram ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml air kloroform LP menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam kemudian disaring. Sejumlah 20 ml filtrat dituang ke dalam cawan

penguap yang telah ditara kemudian diuapkan pada penangas air hingga kering. Residu dipanaskan pada suhu 105°C di oven selama 1 jam hingga penimbangan mencapai bobot tetap. Sebelum melakukan pengeringan ekstrak, cawan penguap dibiarkan mendingin dalam desikator selama 10 menit hingga suhu kamar. Selanjutnya, kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air dihitung terhadap bobot ekstrak awal.

b) Kadar Senyawa yang Larut dalam Etanol

Sejumlah 5,0 gram ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol 96% menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam kemudian disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol. Sejumlah 20 ml filtrat dituang ke dalam cawan penguap yang telah ditara kemudian diuapkan pada penangas air hingga kering. Residu dipanaskan pada suhu 105°C selama 1 jam hingga penimbangan mencapai bobot tetap. Sebelum melakukan pengeringan ekstrak, cawan penguap dibiarkan mendingin dalam desikator selama 10 menit hingga suhu kamar. Selanjutnya, kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol dihitung terhadap bobot ekstrak awal.

c. Karakteristik Ekstrak Non-spesifik (22)

1) Susut Pengerinan

Sejumlah 2 g ekstrak ditimbang dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang, ekstrak diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol hingga merupakan lapisan setebal 5-10 mm. Jika berupa ekstrak kental, ekstrak diratakan dengan bantuan pengaduk kemudian dimasukkan ke dalam ruang pengering, tutup dibuka, dan dikeringkan pada suhu 105°C selama 30 menit hingga penimbangan mencapai bobot tetap. Sebelum melakukan pengeringan ekstrak, botol dibiarkan mendingin dalam keadaan tertutup dalam desikator selama 10 menit hingga suhu kamar.

2) Kadar Air

Sejumlah 10 g ekstrak ditimbang seksama dalam wadah yang telah ditara kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%. Sebelum melakukan pengeringan ekstrak, wadah

dibiarkan mendingin dalam keadaan tertutup dalam desikator selama 10 menit hingga suhu kamar.

3) Kadar Abu

a) Penetapan kadar abu total

Sejumlah 2-3 g ekstrak ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam krus platina atau krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian ekstrak diratakan. Ekstrak dipijarkan perlahan-lahan pada tanur hingga arang habis kemudian didinginkan dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, maka ditambahkan air panas, kemudian disaring melalui kertas saring bebas abu. Sisa kertas saring dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan di dalam krus lalu diuapkan dan dipijar hingga penimbangan mencapai bobot tetap, kemudian ditimbang. Sebelum melakukan pengeringan, krus dibiarkan mendingin dalam keadaan tertutup dalam desikator selama 10 menit hingga suhu kamar. Kadar abu total dihitung terhadap bobot ekstrak awal.

b) Penetapan kadar abu yang tidak larut dalam asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dipanaskan dengan asam sulfat encer P sejumlah 25 ml selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu lalu dicuci dengan air panas, dan dipijar hingga penimbangan mencapai bobot tetap. Sebelum melakukan pengeringan ekstrak, botol dibiarkan mendingin dalam keadaan tertutup dalam desikator selama 10 menit hingga suhu kamar. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bobot ekstrak awal.

d. Identifikasi Kandungan Kimia (23)

1) Identifikasi alkaloid

Sejumlah 2 g ekstrak ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi tiga bagian pada kaca arloji dan ditambahkan pereaksi Mayer LP, Bouchardat LP, dan Dragendorf LP. Pada penambahan Mayer LP, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning yang larut dalam metanol P. Hasil positif Bouchardat LP ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam. Reaksi dengan Dragendorf LP yang positif membentuk endapan merah bata

2) Identifikasi glikosida

Sejumlah 3 g ekstrak ditambahkan 15 ml larutan asam klorida 10% LP, direfluks selama 30 menit, didinginkan, dan disaring. Filtrat yang diperoleh disari sejumlah tiga kali masing-masing dengan 12 ml eter P. Lapisan eter dipisahkan dan dikumpulkan. Pada kumpulan sari ditambahkan natrium sulfat anhidrat P kemudian disaring dan diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50⁰ C. Sisanya dilarutkan dengan 2 ml metanol P. Larutan ini digunakan sebagai larutan percobaan.

(a) Percobaan umum terhadap glikosida

Sejumlah 1 ml larutan percobaan diuapkan di atas penangas air. Sisa dilarutkan dalam 5 ml asam asetat anhidrat kemudian ditambahkan 10 tetes asam sulfat pekat P. Jika terbentuk warna biru atau hijau menunjukkan adanya terpen atau sterol (reaksi Lieberman Burchard).

Sejumlah 1 ml larutan percobaan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian diuapkan di atas penangas air. Sisa ditambahkan 1 ml air dan 5 tetes Molisch LP lalu ditambahkan secara hati-hati 10 tetes asam sulfat pekat P. Jika terbentuk cincin berwarna ungu pada batas cairan menunjukkan adanya ikatan gula (reaksi Molisch).

(b) Percobaan terhadap glikosida jantung

Sejumlah 5 tetes larutan percobaan diencerkan dengan 1 ml metanol kemudian ditambahkan ditambahkan 5 tetes Baljet LP. Bila terbentuk warna jingga setelah beberapa menit menunjukkan adanya glikosida dan aglikon kardenolida (glikosida jantung).

Sejumlah 5 tetes larutan percobaan ditambahkan 5 tetes Kedde LP dan 5 tetes kalium hidroksida 1 N. Bila terjadi warna merah ungu sampai biru ungu dalam beberapa menit menunjukkan adanya glikosida dan aglikon kardenolida (glikosida jantung).

Sejumlah 5 tetes larutan percobaan diuapkan di atas penangas air. Sisa dilarutkan dengan 1 ml asam asetat P dengan sedikit pemanasan, didinginkan kemudian ditetaskan larutan besi (III) klorida 0,3 M. Setelah itu ditambah dengan hati-hati 3 tetes asam sulfat pekat P dan 1 tetes besi (III) klorida 0,3 M. Bila terbentuk cincin berwarna merah coklat pada batas cairan dan setelah beberapa menit di atas cincin berwarna biru hijau menunjukkan adanya glikosida dan glikon 2-desoksigula (reaksi Keller-Kiliani).

(c) Percobaan terhadap glikosida antrakinon

Sejumlah 1 ml larutan percobaan diuapkan di atas penangas air. Residu ditambahkan 1 ml benzen P, dikocok, dan didiamkan.

Lapisan benzen dipisahkan kemudian disaring. Filtrat yang berwarna kuning menunjukkan adanya antrakinin. Lapisan benzen dikocok dengan 1 ml sampai 2 ml natrium hidroksida 2 N kemudian didiamkan. Lapisan air yang berwarna merah intensif dan lapisan benzen yang tidak berwarna menunjukkan adanya antrakinin.

3) Saponin

Sejumlah 0,5 g ekstrak ditambahkan 5 ml aquades panas, dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang.

4) Flavonoid

Sejumlah 3 g ekstrak ditambahkan 10 ml metanol, direfluks selama 10 menit, saring panas melalui kertas saring. Tambahkan 10 ml air dingin dan 5 ml wash benzene, kocok dan diamkan, ambil lapisan metanol uapkan pada suhu 40⁰ C hingga kering. Sisa larutkan dalam 5 ml etil asetat. Larutan ini digunakan sebagai larutan percobaan.

Sejumlah 1 ml larutan percobaan diuapkan hingga kering dan dilarutkan dalam 1 ml etanol 96% kemudian ditambahkan 0,5 g serbuk seng P dan 1 ml asam klorida 2 N, didiamkan selama 1 menit lalu ditambahkan 5 tetes asam klorida pekat P. Jika dalam waktu 2 sampai 5 menit terjadi warna merah intensif, menunjukkan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol).

Sejumlah 1 ml larutan percobaan diuapkan hingga kering dan dilarutkan dalam 1 ml etanol 96% kemudian ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium P dan 5 tetes asam klorida pekat P. Jika terjadi warna merah jingga sampai merah ungu, menunjukkan adanya flavonoid. Jika terjadi warna kuning jingga, menunjukkan adanya flavon, kalkon, dan auron.

Sejumlah 1 ml larutan diuapkan hingga kering, sisanya dibasahkan dengan aseton P kemudian ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat P dan asam oksalat P. Secara hati-hati dipanaskan dipanaskan di atas penangas air dan dihindari pemanasan yang berlebihan. Sisa yang diperoleh dicampur dengan 5 ml eter P. Perubahan warna diamati dengan sinar UV 366 nm. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan fluoresensi kuning intensif.

5) Tanin

Sejumlah 1% larutan ekstrak dalam air panas dikocok hingga homogen. Larutan disentrifugasi dan diambil bagian jernihnya. Filtrat dibagi dua dan masing-masing ditambahkan dengan pereaksi yang berbeda yaitu natrium klorida-gelatin dan besi(III) klorida 3%. Hasil positif pemberian larutan natrium klorida-gelatin ditunjukkan dengan endapan putih. Penambahan larutan besi(III) klorida 3% menunjukkan hasil positif jika terbentuk larutan biru kehitaman atau hijau kehitaman (24).

3. Penyiapan Hewan Uji

Tikus putih jantan yang akan digunakan untuk percobaan diaklimatisasi terlebih dahulu selama 14 hari dalam kandang di Laboratorium Farmakologi Departemen Farmasi FMIPA UI. Tikus tersebut diberi makan, minum, dan ditimbang secara teratur setiap hari serta dibiasakan dengan kondisi lingkungan baru. Tikus yang sehat saja yang diikutsertakan dalam percobaan.

4. Penetapan Dosis

a. Penetapan Dosis Sediaan Uji

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan dosis yang digunakan secara empiris oleh masyarakat yaitu sejumlah 45 gram daun segar. Jika menggunakan daun kering maka setara dengan 12,77 gram daun kering (Tabel 5). Faktor konversi dari manusia ke tikus adalah 0,018 dan faktor farmakokinetik yang digunakan adalah 10. Dosis untuk tikus = $12,77 \text{ g} \times 0,018 \times 10 = 2,3 \text{ g}/200 \text{ g}$ bb daun kering. Setelah dikonversikan untuk tikus, maka dosis yang digunakan sebagai berikut (Lampiran 1):

1. Dosis I : Dosis 0,5 kali yaitu 1,15 g/200 g bb daun kering
2. Dosis II : Dosis 1 kali yaitu 2,3 g/200 g bb daun kering
3. Dosis III: Dosis 2 kali yaitu 4,6 g/200 g bb daun kering

Pada tikus yang digunakan sebagai hewan uji yang akan diberikan adalah ekstrak. Maka, dosis untuk satu tikus: Berat dosis daun kering X rendeman ekstrak (Lampiran 2). Nilai rendemen ekstrak adalah 30% (Tabel 6). Sehingga dosis ekstrak yaitu:

1. Dosis I : Dosis 0,5 kali yaitu 0,345 g/200 g bb ekstrak

2. Dosis II : Dosis 1 kali yaitu 0,69 g/200 g bb ekstrak

3. Dosis III: Dosis 2 kali yaitu 1,38 g/200 g bb ekstrak

Ekstrak yang diperoleh dari rebusan, ditimbang sesuai dengan berat dosis yang diinginkan. Pengenceran dosis dilakukan dari dosis terbesar ke dosis yang lebih kecil. Ekstrak disuspensikan dengan Na-CMC 0,5% sampai volume yang dikehendaki. Suspensi Na-CMC 0,5% dibuat dengan cara mengembangkan 500 mg Na-CMC dalam 20 kali air panas selama 30 menit, kemudian dihomogenkan dan ditambahkan air hingga 100 ml.

Volume pemberian untuk masing-masing tikus adalah sama yaitu 3 ml/200 g bb.

c. Penetapan Dosis Perbandingan Alopurinol

Dosis alopurinol yang digunakan adalah 200 mg sehari untuk manusia. Faktor konversi dari manusia ke tikus adalah 0,018; dan faktor farmakokinetik yang digunakan adalah 10. Dosis untuk tikus = $200 \text{ mg} \times 0,018 \times 10 = 36 \text{ mg/200 g bb}$. Sejumlah 300 mg serbuk alopurinol ditimbang kemudian disuspensikan dengan Na-CMC 0,5% sampai volume 25 ml sehingga didapatkan konsentrasi alopurinol 12 mg/ml. Volume pemberian untuk masing-masing tikus adalah 3 ml/200 g bb.

d. Penetapan Dosis Pembanding Jamu Herbal “X”

Dosis yang digunakan berdasarkan dosis untuk manusia yang tertera pada etiket sediaan jadi yang telah beredar di pasaran. Dosis manusia adalah 2 kapsul atau 940 mg/hari, dosis untuk tikus: $0,018 \times 10 \times 940 = 170 \text{ mg}/200 \text{ g bb}$. Sejumlah 1,417 g jamu herbal X ditimbang, kemudian disuspensikan dengan Na-CMC 0,5% sampai volume 25 ml sehingga didapatkan konsentrasi 56,67 mg/ml. Volume pemberian untuk masing-masing tikus adalah 3 ml/200 g bb.

e. Penetapan Dosis Induksi Kalium Oksonat

Dosis untuk membuat hewan uji hiperurisemia adalah 250 mg/kg bb. Maka didapatkan dosis untuk satu ekor tikus 50 mg/200 g bb. Sejumlah 2,083 g kalium oksonat ditimbang dan disuspensikan dengan Na-CMC 0,5% sampai volume 25 ml sehingga didapatkan konsentrasi 83,33 mg/ml. Untuk dosis 50 mg/200 g BB, maka yang di injeksikan sejumlah $50 \text{ mg}/200 \text{ g bb} : 83,33 \text{ mg/ml} = 0,6 \text{ ml}/200 \text{ g bb}$.

6. Perlakuan

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan jenis Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana 35 ekor tikus putih jantan dibagi secara acak menjadi tujuh kelompok perlakuan dan tiap kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor (25).

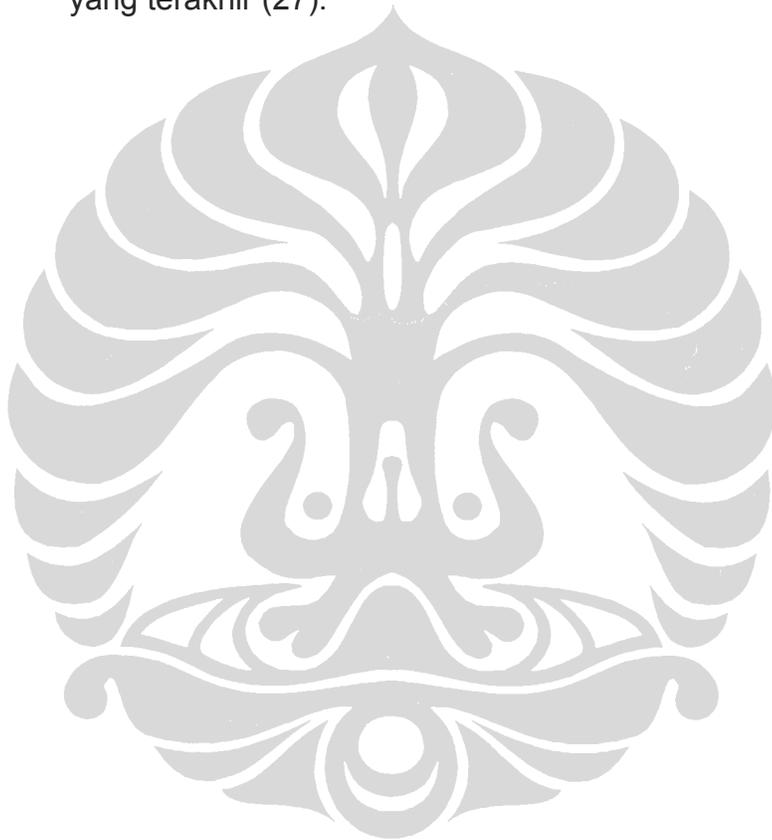
Kelompok I, II, dan III sebagai kelompok dosis yaitu dosis I, dosis II, dan dosis III. Kelompok IV adalah kelompok pembanding alopurinol. Kelompok V adalah kelompok pembanding jamu herbal "X". Kelompok VI adalah kelompok kontrol induksi dan kelompok VII adalah kelompok kontrol normal (Gambar 15).

Pada penelitian ini perlakuan dilakukan selama delapan hari. Pada hari ke-1 sampai dengan hari ke-7 diberikan sediaan uji secara oral satu kali dalam sehari pada kelompok I, II, dan III sesuai dengan kelompok dosis (26). Pembanding alopurinol diberikan secara oral pada kelompok IV. Pembanding jamu herbal "X" diberikan secara oral pada kelompok V. Suspensi Na-CMC 0,5% diberikan secara oral pada kelompok VI (kontrol induksi) dan kelompok VII (kontrol normal) (Gambar 16).

Pada hari ke-8 diberikan induksi kalium oksonat pada kelompok I sampai kelompok VI dan pada kelompok VII diberikan Na-CMC 0,5% secara intraperitoneal (Gambar 17). Satu jam kemudian diberikan sediaan uji ekstrak yang terakhir secara oral pada kelompok I, II, dan

III serta alopurinol dan jamu herbal “X” secara oral pada kelompok IV dan V. Pada kelompok VI (kontrol induksi) dan VII (kontrol normal) diberikan Na-CMC 0,5% secara oral (27).

Pengambilan darah dilakukan setelah dua jam pemberian induksi kalium oksonat atau satu jam setelah pemberian sediaan uji yang terakhir (27).



Tabel 1

Perlakuan setiap kelompok selama 8 hari

Ke	Perlakuan			
	Hari ke-1 sampai ke-7		Hari ke-8	
		Awal	Setelah 1 jam	Setelah 2 jam
I	Dosis I yaitu 0,345 g/200 g bb ekstrak secara oral	Induksi kalium oksonat secara intraperitoneal	sediaan uji dosis I	Pengambilan darah
II	Dosis II yaitu 0,69 g/200 g bb ekstrak secara oral	Induksi kalium oksonat secara intraperitoneal	sediaan uji dosis II	Pengambilan darah
III	Dosis III yaitu 1,38 g/200 g bb ekstrak secara oral	Induksi kalium oksonat secara intraperitoneal	sediaan uji dosis III	Pengambilan darah
IV	Alopurinol 36 mg/200 g bb secara oral	Induksi kalium oksonat secara intraperitoneal	sediaan alopurinol	Pengambilan darah
V	Jamu herbal "X" 170mg/200 g bb secara oral	Induksi kalium oksonat secara intraperitoneal	sediaan jamu herbal "X"	Pengambilan darah
VI	Na-CMC 0,5% secara oral	Induksi kalium oksonat secara intraperitoneal	Na-CMC 0,5%	Pengambilan darah
VII	Na-CMC 0,5% secara oral	Na-CMC 0,5% secara intraperitoneal	Na-CMC 0,5%	Pengambilan darah

7. Pengambilan Darah

Pengambilan darah dilakukan menggunakan pipet hematokrit dengan memutar sambil ditekan pada sinus orbital mata tikus yang terlebih dahulu dianastesi secara inhalasi dengan eter (Gambar 18) (28). Darah yang diperoleh ditampung dalam vial sampel yang telah diberi heparin, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 5 menit. Plasma yang diperoleh, dipisahkan, dan dilakukan pengukuran kadar asam urat.

8. Penetapan Kadar Asam Urat dalam Plasma

Penetapan kadar asam urat dalam plasma dilakukan dengan metode urikase secara kolorimetri-enzimatis, menggunakan pereaksi komersial untuk asam urat (Randox) (Lampiran 3) (29).

Prinsip reaksinya adalah mengoksidasi asam urat menjadi alantoin, hidrogen peroksida, dan karbon dioksida yang dikalisis oleh urikase. Hidrogen peroksida yang terbentuk bereaksi dengan 3,5-dikloro-2-hidroksibenzensulfonat (DCHBS) dan 4-aminophenazon (PAP) membentuk zat warna quinonimin yaitu N-(4-antipiril)-3-kloro-5-sulfonat-p-benzokuinonimuin yang diukur pada panjang gelombang 520 nm dengan menggunakan spektrofotometer (14,15).

Pada kuvet blanko, sampel, dan standar dimasukkan 1000 µl peraksi asam urat (Randox). Pada kuvet sampel ditambahkan 20 µl plasma dan pada kuvet standar ditambahkan 20 µl standar. Selanjutnya dikocok dan masing-masing diinkubasi pada suhu 25⁰ C selama 15 menit hingga terbentuk warna merah-ungu. Warna senyawa stabil selama 30 menit sejak diinkubasi (Gambar 19 dan 20) (15,29).

Tabel 2

Penetapan kadar asam urat

Kuvet	Pereaksi	Plasma	Standar
Blanko	1000 µl	-	-
Sampel	1000 µl	20 µl	-
Standar	1000 µl	-	20 µl

Besarnya kadar asam urat ditentukan dengan rumus (29):

$$\text{Kadar asam urat} = \frac{\text{Serapan sampel}}{\text{Serapan standar}} \times \text{kadar asam urat standar}$$

9. Analisis Data

Data yang diperoleh diolah secara statistik menggunakan SPSS 15.0. Analisis yang dilakukan yaitu uji homogenitas (Levene) dan uji kenormalan (Saphiro-Wilk), selanjutnya dilakukan analisis varian satu arah (ANAVA) untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan. Bila terdapat perbedaan bermakna, maka untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) (30).

