

BAB IV

PROSEDUR PERCOBAAN

4.1. Pengambilan Sampel dan Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang dilakukan pada penelitian ini adalah biji bunga matahari *Heliantus annus* L. yang diambil dari daerah Jalan Cagak Subang Jawa Barat. Determinasi dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

4.2. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia ini bertujuan untuk menganalisis tumbuhan dan mengetahui kandungan bioaktif yang berguna untuk pengobatan

1) Senyawa Alkaloid

Serbuk biji bunga matahari 2 g ditempatkan ke dalam mortar basah, lalu ditambahkan 5mL amoniak, dan 20 ml kloroform dicampur kemudian digerus kembali dengan kuat. Campuran disaring kemudian filtrat larutan organik diambil sebagai larutan A. Sebagian filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan asam klorida 10% v/v. lalu fraksi air dipisahkan sebagai larutan B. Larutan A diteteskan pada kertas saring, lalu disemprotkan dengan preaksi Dragendroff, dan terbentuknya warna merah atau jingga pada kertas menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid. Larutan B dibagi menjadi 2 bagian di dalam tabung reaksi, tabung pertama

ditambahkan pereaksi Dragendroff, dan tabung kedua ditambahkan pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan merah bata dengan pereaksi dragendroff atau endapan putih dengan pereaksi Mayer menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid (Fransworth, 1966:264-265).

2) Senyawa Polifenolat

Serbuk biji bunga matahari 1 g ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, lalu dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Kepada filtrate ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida dan timbulnya warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru-hitam hingga hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menunjukkan adanya fenolat. (Fransworth, 1966:262-263).

3) Senyawa Flavonoid

Serbuk biji bunga matahari sebanyak 1 g ditempatkan pada gelas kimia, lalu ditambahkan 100mL air panas dan didihkan selama 10 menit. Kemudian campuran disaring, filtrate ditampung sebagai larutan C yang nantinya akan digunakan untuk pemeriksaan golongan senyawa flavonoid, saponin, dan kuinon. Larutan C sebanyak 5mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium dan 1mL asam klorida pekat. Campuran ditambahkan amilalkohol, dikocok dengan kuat lalu dibiarkan hingga terjadi pemisahan. Terbentuknya warna dalam lapisan amilalkohol menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid (Fransworth, 1966:264-265).

4) Senyawa Saponin

Sebanyak 5mL larutan C dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu dikocok selama 10 detik. Dibiarkan selama 10 menit, kemudian diamati. Terbentuknya busa 1cm yang stabil didalam tabung reaksi menunjukkan adanya golongan senyawa saponin. Busa tersebut masih tetap ada setelah ditambahkan beberapa tetes asam klorida (Fransworth, 1966:265-266).

5) Senyawa Kuinon

Sebanyak 5 mL larutan C dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan beberapa tetes larutan Natrium hidroksida 1 N. terbentuknya warna kuning hingga merah menandakan adanya golongan senyawa kuinon (Fransworth, 1966:264-265).

6) Senyawa Tanin

Serbuk biji bunga matahari 1 gram ditambahkan 100mL air panas, kemudian dididihkan selama 15 menit. Campuran kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian didalam tabung reaksi. Filtrat pertama ditambahkan larutan besi (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru atau hitam kehijauan menunjukkan adanya golongan senyawa tanin. Filtrat kedua ditambahkan gelatin 1%, terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya golongan tanin, dan filtrat ketiga ditambahkan 15 mL pereaksi steasny, lalu dipanaskan diatas penangas. Terbentuknya endapan merah muda menunjukkan adanya tanin katekat. Hasil uji filtrat

ketiga disaring, kemudian diendapkan dengan ditambahkan natrium asetat, kemudian beberapa tetes larutan besi (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tannin galat. (Fransworth, 1966:262-263).

7) Senyawa Monoterpen dan sesquiterpen

Serbuk digerus 1 gr dengan eter lalu disaring. Filtrat yang didapat ditempatkan didalam cawan penguap dan dibiarkan menguap hingga kering, lalu ditambahkan vanillin 10% dalam asam klorida pekat dan timbulnya warna-warna menandakan positif mengandung senyawa monoterpen dan sesquiterpen (Fransworth, 1966:264-265).

8) Senyawa Triterpenoid dan Steroid

Serbuk 1 g di gerus dengan eter lalu disaring. Filtrat yang didapat ditempatkan dalam cawan penguap lalu dibiarkan mengering, kemudian ditambahkan larutan pereaksi Liebermann-Burchard dan terbentuknya warna merah ungu menandakan adanya senyawa terpenoid, sedangkan bila warnanya hijau-biru menandakan positif adanya steroid (Fransworth, 1966:265-266).

4.3. Penyiapan Hewan

Digunakan hewan coba mencit putih Swiss Webster jantan berumur 2-3 bulan, mencit putih dipilih mudah didapat, relatif murah, sangat mudah ditangani sensitif terhadap rangsangan obat dengan berat badan antara 20-30 g, sehat, bulu tidak kusam, peka terhadap rangsangan sekitar dan gesit, diperhatikan juga keseragaman hewan coba yang digunakan seperti usia, jenis kelamin jantan.

Hewan diadaptasikan pada lingkungan baru selama satu minggu, selama pemeliharaan hewan coba diamati kondisinya dan dilakukan penimbangan berat badan dari hari kehari dan pengamatan visual lainnya.

4.4. Pembuatan Ekstrak

Biji bunga matahari, dibersihkan terlebih dahulu dimana biji dibersihkan dari debu yang menempel lalu di sortasi. Kemudian biji di keringkan dengan diangin-anginkan dengan cara diangin-anginkansampai menjadi simplisia kering, bahan yang telah kering dihaluskan menjadi serbuk kemudian disimpan di dalam wadah kedap udara dan terlindung dari cahaya matahari. Lalu di ekstraksi dengan alat sokhlet (cara panas) pastikan alat sokhlet bersih, timbang sebanyak 400 g simplisia dari biji bunga matahari, masukan kedalam tabung berpori tempatkan dibagian dalam alat sokhlet, bagian bawah alat sokhlet disambungkan dengan labu destilasi yang berisi pelarut etanol 96% dan batu didih, sedangkan bagian atas di sambungkan dengan kondensor. Perbandingan simplisia dengan pelarut 1:3, buka aliran air yang masuk ke kondensor, lalu nyalakan pemanas lakukan ekstraksi hingga tetesan tidak berwarna lagi kemudian dinginkan simpan dalam wadah penampung lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 30°-40°C lalu dipekatkan kembali diatas *waterbath* 60°C sampai menjadi ekstrak kental. Rumus perhitungan rendemen ekstrak

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak (gr)}}{\text{berat simplisia (gr)}} \times 100 \%$$

4.5. Perlakuan hewan uji

Sebelum perlakuan mencit dikelompokkan secara acak dibagi menjadi enam kelompok, yaitu:

Kelompok 1 : diberikan pakan standar + suspensi CMC Na 1 %

Kelompok 2 : diberikan pakan standar + PTU + CMC-Na 1 %

Kelompok 3 : diberikan pakan standar + PTU + suspensi simvastatin 0,02 gr/Kg BB

Kelompok 4 : diberikan pakan standar + PTU + ekstrak etanol biji bunga matahari dosis rendah 1,9 g/Kg BB

Kelompok 5 : diberikan pakan standar + PTU + ekstrak etanol biji bunga matahari dosis terapi 3,9 g/Kg BB

Kelompok 6 : diberikan pakan standar + PTU + ekstrak etanol biji bunga matahari dosis tinggi 7,8 g/Kg BB

Hewan uji diberikan makanan dan minuman dalam jumlah yang sama setiap hari seluruh kelompok pada masa adaptasi, setelah itu 14 hari sebelum induksi mencit dipuaskan lalu diberikan induksi PTU yang berfungsi meningkatkan kadar kolesterol dengan cara menghambat sintesis hormon tiroid kecuali kelompok kontrol dimana induksi ini dilakukan selama 2 minggu, setelah mencit diberikan induksi PTU selama 2 minggu, diamati kenaikan kadar kolesterol. Setelah ada kenaikan kadar kolesterol dianalisis menggunakan uji *paired sample t test* untuk melihat keberhasilan induksi lalu diberikan ekstrak etanol biji bunga matahari pada kelompok 4, 5, dan 6 pemberian ekstrak selama 2

minggu dimana dilakukan pemberian ekstrak secara oral yang diberikan setiap hari.

4.6. Pengambilan Sampel Darah

Sebelum sampel darah diambil, mencit dipuasakan selama 16 jam. Ekor mencit dibersihkan dengan alkohol 96%, kemudian dipotong kira-kira 2-4mm dari bagian ujung dengan menggunakan gunting. Dari bagian pangkal mencit, ekor diurut perlahan sehingga darah keluar dan disentuhkan ujung ekor ke alat *strip test* yang sebelumnya telah dimasukan strip ke meter alat yang sudah menyala dan nomor kode pengecekan kolesterol sudah diatur sampel darah yang tersedot akan masuk kedalam zona reaksi otomatis. Zona reaksi strip minimal menampung 10 μ L darah, lalu tunggu beberapa detik sampai hasil test muncul. Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke $-14, 0, 7, 14$ terhitung sejak hari ke -14 (sebelum induksi), t_0 (sesudah induksi), dan hari ke 7 dan 14 (setelah pemberian sediaan uji). Skema prosedur percobaan dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

4.7. Teknik Analisis Data

Dari data yang diperoleh maka dilakukan analisis data terhadap keberhasilan induksi, sebelum dan sesudah induksi menggunakan *paired sampel t test* dan untuk membandingkan efek perubahan kadar kolesterol antara kelompok kontrol positif terhadap pembanding dan uji, ketiga variasi uji, dan pembanding terhadap uji dilakukan uji statistik uji ANOVA dan uji lanjutan Tukey HSD setelah 14 hari terapi.