

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Penyiapan Bahan dan Determinasi

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini daging buah salak *Salacca zalacca* (Gaertner) Voss yang diperoleh dari Kampung Jambu, Sumedang, Jawa Barat. Kemudian determinasi dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung (ITB), untuk memastikan identitas tanaman yang digunakan.

Tahap penyiapan simplisia di mulai dari pengumpulan bahan (panen) buah salak. Daging buah salak ini diambil dari buah yang sudah matang yaitu sekitar 5-6 bulan dimana warna kulit buah cokelat sampai kehitaman dan menghasilkan aroma khas yang cukup kuat. Kemudian dilakukan sortasi basah, pencucian menggunakan air mengalir hingga bersih dari tanah yang menempel. Setelah itu daging buah salak dipisahkan dari kulit dan bijinya. Buahnya kemudian dipotong-potong menjadi ukuran kecil kemudian dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 40°C selama 5 hari. Setelah itu dilakukan sortasi kering dan simplisia dibungkus dalam plastik serta disimpan dalam wadah tertutup rapat.

4.2. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Penapisan fitokimia ini meliputi tes terhadap adanya golongan alkaloid, polifenolat, flavonoid,

saponin, tanin, kuionon, monoterpen dan sesquiterpen, serta steroid dan triterpenoid.

4.2.1. Alkaloid

Sejumlah simplisia uji atau ekstrak ditambahkan dengan 10 ml amonia 25 %, lalu di tambah 20 ml kloroform dan digerus kuat. Campuran disaring dan filtrat digunakan untuk percobaan (larutan A). Larutan A ditetaskan pada kertas saring dan diberi pereaksi Dragendroff. Warna jingga yang timbul pada kertas saring menunjukkan alkaloid positif. Sisa larutan A dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan dengan asam klorida 10 % lalu lapisan air atau fraksi asamnya dipisahkan (larutan B). Masing-masing 5 ml Larutan B dalam tabung reaksi diuji dengan pereaksi Mayer, Hasil Positif bila endapan putih dan hasil positif pada uji dengan pereaksi Dragendorff bila terbentuk endapan merah bata (Kusumardiyani,1992:18).

4.2.2. Polifenolat

Sejumlah simplisia uji atau ekstrak yang ditambahkan dengan air secukupnya, dididihkan selama 5 menit, kemudian di saring. Larutan pereaksi besi (III) klorida ditambahkan kedalam filtrat dan timbulnya warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru hitam hingga hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1996:225).

4.2.3. Flavonoid

Sejumlah simplisia uji atau ekstrak ditambahkan dengan air secukupnya, dididihkan 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan serbuk magnesium, asam klorida 2N dan amil alkohol, dan dikocok kuat-kuat dan kemudian

dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid (Kusumardiyani, 1992:53).

4.2.4. Saponin

Sejumlah simplisia uji atau ekstrak ditambahkan dengan air secukupnya, di didihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat dalam tabung reaksi dikocok vertikal selama 10 detik, kemudian di biarkan selama 10 menit dengan ketinggian 1-10 cm maka saponin positif. Busa ditambah dengan asam klorida 2N beberapa tetes, apabila busa hilang maka saponin negatif sedangkan jika busa tidak hilang maka saponin positif (Kusumardiyani, 1992:36).

4.2.5. Tanin

Sejumlah simplisia uji atau ekstrak ditambahkan dengan air secukupnya, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi tiga. Pertama, filtrat dengan FeCl_3 akan terbentuk warna hijau, violet, atau hitam (tanin positif). Kedua, filtrat ditambahkan dengan gelatin 1 % terbentuk endapan maka tanin positif, dan filtrat ketiga ditambahkan pereaksi Steasny, timbulnya endapan merah muda sampai merah bata menandakan positif tanin katekat (Farnsworth, 1996:264).

4.2.6. Kuinon

Sejumlah simplisia uji atau ekstrak ditambahkan dengan air secukupnya, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan larutan NaOH 5% apabila terbentuk warna jingga menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966:265).

4.2.7. Monoterpen dan sesquiterpen

Sejumlah serbuk simplisia atau ekstrak di gerus dengan eter, kemudian dipipet sambil di saring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, ditambahkan larutan vanilin 10 % dalam asam sulfat pekat. Warna-warna yang timbul menandakan positif senyawa monoterpen dan sesquiterpen (Depkes RI, 1977:132).

4.2.8. Triterpenoid dan steroid

Sejumlah serbuk simplisia uji atau ekstrak digerus dengan eter, lalu dipipet sambil di saring. Filtrat di tempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu di tambahkan larutan pereaksi Lieberman-Burchard. Warna ungu, merah atau merah muda yang timbul menandakan positif triterpenoid, sedangkan bila warna hijau biru atau biru yang timbul menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1966:259).

4.3. Pengujian Parameter Simplisia

4.3.1. Kadar air

Kadar air pada simplisia di tetapkan dengan destilasi azeotrop. Disiapkan simplisia sebanyak \pm 20 gram dan toluene jenuh 200 ml yang kemudian di masukan kedalam labu bundar dan dihubungkan dengan alat destilasi. Panaskan labu bundar pada pemanas hingga toluen mendidih, atur kecepatan tetesan hingga 4 tetes per detik dan tunggu hingga air pada tabung penerima konstan. Bilas bagian pendingin toluen dan lakukan penyulingan kembali selama 5 menit. Setelah itu matikan pemanas dan tunggu hingga air dan toluen pada tabung penerima

terpisah semua. Pengujian kadar air dilakukan secara duplo (Depkes, 2000:16).

Kadar air dapat di hitung dengan rumus:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume air} \times B_j \text{ air}}{\text{berat simplisia}} \times 100 \% \quad (1).$$

4.3.2. Kadar sari larut air

Kurang lebih 5 gram simplisia ditimbang dimasukkan kedalam elenmeyer berpenutup. Sampel dimaserasi selama 24 jam dengan air-kloroform P, sambil sampel sekali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Kemudian sampel disaring, 20 ml filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang telah dipanaskan 105^0 dan ditara, lalu dipanaskan hingga 105^0 hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam % sari larut air (Depkes RI, 2009:171).

4.3.3. Kadar sari larut etanol

Kurang lebih 5 gram simplisia ditimbang dimasukkan kedalam elenmeyer berpenutup. Sampel dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol 95%, sambil sampel sekali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Kemudian sampel disaring, 20 ml filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang telah dipanaskan 105^0 dan ditara, lalu dipanaskan hingga 105^0 hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam % sari larut air (Depkes RI, 2009:171).

4.3.4. Kadar abu total

Kurang lebih 2 gram serbuk simplisia dimasukkan kedalam kurs silikat yang telah dipijarkan dan ditara. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dalam desikator dan timbang. Lakukan hingga bobot tetap dan di lakukan duplo (Depkes,2000;17). Kadar abu total dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{kadar abu}}{\text{berat simplisia}} \times 100 \% \quad (2).$$

4.3.5. Kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 ml HCl encer selama 25 menit, dan dikumpulkan abu yang tidak larut dengan menyaring pada kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas dan di pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Pengujian dilakukan secara duplo (Depkes, 2000; 17). Kadar abu tidak larut asam dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu tidak larut asam}}{\text{berat simplisia}} \times 100 \% \quad (3).$$

4.4. Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Salak

Ekstrak buah salak dibuat dengan cara simplisia buah salak diekstraksi secara remaserasi sebanyak 3 kali pada suhu kamar dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan simplisia dan pelarut (1:3) selama 3 hari. Maserat pertama ditampung setelah 24 jam dan di lakukan penggantian pelarut baru, sedangkan maserat kedua dan ketiga ditampung setelah 24 jam. Ekstrak cair yang diperoleh, dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dan selanjutnya dibuat lebih kental dengan menguapkan pelarut menggunakan *waterbath* sampai diperoleh ekstrak kental. Rendemen ekstrak dapat di hitung dengan cara :

$$\text{rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100 \% \quad (4).$$

4.5. Pembuatan Sediaan

4.5.1. Pembuatan suspensi uji buah salak

Berdasarkan penelitian Priyatno *et.al* (2012) terbukti bahwa pada dosis 100 mg/ kg bb tikus dan 200 mg /kg bb tikus dapat menurunkan kadar asam urat pada serum yang telah diketahui asam urat apabila mengendap pada jaringan maka akan menyebabkan inflamasi yang biasanya terjadi pada sekitar sendi. Sehingga dosis ekstrak terendah yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada penelitian tersebut yaitu 200 mg/ kg bb tikus dan selanjutnya penentuan dosis yang berjenjang menjadi 2 kali lipat yaitu 400 mg / kg bb tikus dan 800 mg/kg bb tikus. Ekstrak uji disuspensikan dalam CMC-Na 0,5 % hingga homogen dan diberikan secara oral 3 ml / 200 g bb tikus.

4.5.2. Pembuatan suspensi pembanding

Dalam penelitian ini suspensi pembanding menggunakan tablet Natrium diklofenak 50 mg. Cara pembuatannya dengan menimbang tablet Natrium diklofenak setara dengan natrium diklofenak 0,9 mg / 200 g bb tikus kemudian disuspensikan dalam CMC 0,5% hingga homogen dan diberikan secara oral 3 ml / 200 g bb tikus.

4.6. Pengujian Induksi Karagenan

Tikus diaklimasi selama 3 minggu dalam kandang. Tikus dipilih secara acak untuk dilakukan pengujian induksi karagenan 1%, volume kaki tikus diukur dengan alat pletismometer kemudian tikus diinduksi 0,2 ml karagenan 1%. Volume kaki tikus diukur setelah induksi selama 5 jam pengukuran dilakukan

dengan waktu 1 jam, 2 jam, 3 jam, 4 jam, 5 jam, pengujian dilakukan secara duplo. Lalu dilakukan pengolahan data secara statistik untuk mengetahui perbedaan bermakna kaki tikus pada waktu setelah induksi dengan waktu sebelum induksi.

4.7. Pengujian Aktivitas Antiinflamasi Induksi Karagenan

Tikus diaklimasi selama 3 minggu dalam kandang agar bisa menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru. Selama masa aklimasi tikus diberi makan dan minuman yang seragam dan dilakukan pengamatan yang rutin terhadap keadaan umum serta penimbangan berat badan tikus. Tikus yang digunakan yaitu 30 tikus wistar jantan, tikus dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu kontrol positif, kontrol negatif, kelompok dosis 200 mg/kg bb, dosis 400 mg/kg bb, dosis 800 mg/kg bb dan pembanding yaitu suspensi natrium diklofenak. Semua kelompok diberi masing-masing perlakuan masing-masing sebagai berikut.

Kelompok Kontrol : tikus diberi suspensi CMC-Na 0,5 % secara oral; sebagai kontrol positif digunakan kaki kiri tikus yang diinduksi 0,2 ml karagenan, dan sebagai kontrol negatif digunakan kaki kanan tikus yang diinduksi 0,2 ml NaCl 0,9%.

Kelompok uji 1 : tikus diberi suspensi ekstrak buah salak 200 mg /kg bb secara oral lalu kaki kiri tikus diinduksi 0,2 ml karagenan.

Kelompok uji 2 : tikus di beri suspensi ekstrak buah salak 400 mg /kg bb secara oral lalu kaki kiri tikus diinduksi 0,2 ml karagenan.

Kelompok uji 3 : tikus diberi suspensi ekstrak buah salak 800 mg /kg bb secara oral lalu kaki kiri tikus diinduksi 0,2 ml karagenan.

Kelompok Pembanding : tikus diberi suspensi Natrium diklofenak 0,9 mg/200 g bb tikus secara oral lalu di induksi 0,2 ml karagenan.

4.8. Pengukuran Volume Udem

Tikus dipuasakan ± 18 jam sebelum pengujian air minum tetap diberikan. Volume kaki kiri tikus diukur dengan cara mencelupkannya ke dalam alat pletismometer untuk setiap selang waktu 1 jam selama 6 jam setelah penyuntikan suspensi karagenan (jam ke 1,2,3,4,5,dan ke 6).

4.9. Analisis Data

Setelah pengukuran volume udem kaki kiri tikus, dilakukan analisis data metode ANOVA dan uji lanjutan LSD untuk melihat perbedaan bermakna secara statistik dari efek antinflamasi antar kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok uji, dan kelompok pembanding. Dilakukan uji student T untuk melihat keberhasilan induksi karagenan pada kaki tikus secara intraplantar .