

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Pengumpulan dan Determinasi Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan adalah kulit buah salak (*Salacca zalacca* (Gaertner.) Voss) yang diperoleh dari perkebunan salak Kampung Jambu, Sumedang, Jawa Barat. Lalu determinasi dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung (ITB).

4.2. Penyiapan Simplisia Kulit Buah Salak

Tahap penyiapan simplisia dimulai dari pengumpulan bahan (panen) buah salak. Kulit buah salak yang diambil ketika buah sudah matang sekitar berumur 5-6 bulan, kulit buah berwarna coklat sampai kehitaman dan aromanya yang khas. Selanjutnya dilakukan sortasi basah, dicuci dengan air mengalir hingga bersih dari tanah dan matriks lain yang tidak digunakan. Kemudian buah salak tersebut dikupas dan bagian kulit buah salak dipisahkan, dipotong menjadi ukuran kecil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 1 minggu. Setelah diperoleh kulit buah salak yang telah mengering, tahap berikutnya yaitu penyimpanan. Kulit buah salak disimpan di dalam wadah tertutup rapat.

4.3. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap simplisia dan ekstraknya untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Penapisan fitokimia

ini meliputi uji alkaloid, polifenolat, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, monoterpen dan seskuiterpen, triterpenoid dan steroid.

4.3.1. Alkaloid

Sejumlah serbuk simplisia uji atau ekstrak ditempatkan ke dalam mortar basah, ditambahkan dengan 5 mL amoniak, lalu ditambah 20 mL kloroform dan digerus kuat. Campuran disaring dan filtrat digunakan sebagai larutan A. Sebagian larutan A dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan asam klorida 10% v/v. Kemudian fraksi air dipisahkan sebagai larutan B. Sebagian larutan A diteteskan pada kertas saring dan disemprotkan dengan pereaksi Dragendorff. Warna jingga yang muncul pada kertas saring menunjukkan positif alkaloid. Larutan B dibagi menjadi 2 bagian di dalam tabung reaksi, tabung pertama ditambahkan pereaksi Dragendorff, dan tabung kedua ditambahkan pereaksi Mayer hasil positif bila endapan putih dan hasil positif pada uji dengan pereaksi Dragendorff bila terbentuk endapan merah bata (Farnsworth, 1966:254).

4.3.2. Polifenolat

Sejumlah serbuk simplisia uji atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, dipanaskan di atas penangas air kemudian disaring. Larutan pereaksi besi (III) klorida ditambahkan ke dalam 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, 1966:264).

4.3.3. Flavonoid

Sejumlah simplisia uji atau ekstrak ditempatkan pada gelas kimia, kemudian ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 10 menit, kemudian disaring. Filtrat ditampung sebagai larutan C dapat digunakan untuk pemeriksaan golongan senyawa flavonoid, saponin, dan kuinon. Lalu larutan C sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan serbuk magnesium, 1 mL asam klorida pekat dan amil alkohol, dan dikocok kuat dan dibiarkan hingga terjadi pemisahan. Terbentuknya warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid (Farnsworth, 1966:262).

4.3.4. Saponin

Sebanyak 5 mL larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok selama 10 detik. Dibiarkan selama 10 menit, kemudian diamati. Terbentuknya busa 1 cm yang stabil di dalam tabung reaksi menunjukkan positif saponin. Busa tersebut masih tetap ada setelah ditambahkan beberapa tetes asam klorida (Depkes RI, 1989:167).

4.3.5. Kuinon

Sebanyak 5 mL larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N. Apabila membentuk warna kuning hingga merah menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966:259).

4.3.6. Tanin

Sejumlah serbuk simplisia uji atau ekstrak ditambahkan 100 mL air panas, kemudian dididihkan selama 15 menit. Kemudian didinginkan dan saring. Filtrat dibagi menjadi tiga. Pertama, filtrat ditambahkan dengan besi (III) klorida 1%

akan terbentuk warna biru atau hitam kehijauan (tanin positif). Kedua, filtrat ditambahkan dengan gelatin 1% terbentuk endapan putih maka tannin positif, dan filtrat ketiga ditambahkan 15 mL pereaksi Steasny lalu dipanaskan diatas penangas, timbulnya endapan merah muda sampai merah bata menandakan positif tanin katekat. Hasil uji filtrat ketiga disaring, kemudian dijenuhkan dengan ditambahkan natrium asetat, kemudian beberapa tetes larutan besi (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tanin galat (Farnsworth, 1966:264).

4.3.7. Monoterpen dan seskuiterpen

Sejumlah serbuk simplisia uji atau ekstrak digerus dengan eter, kemudian dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, ditambahkan larutan vanilin 10% dalam asam klorida pekat. Warna-warna yang timbul menandakan positif senyawa monoterpen dan seskuiterpen (Depkes RI,1989:132).

4.3.8. Triterpenoid dan steroid

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

4.4. Pengujian Parameter Simplisia Spesifik dan Non Spesifik

4.4.1. Pengujian parameter simplisia spesifik

a. Kadar sari larut air

Keringkan serbuk di udara, maserasi selama 24 jam 5,0 g serbuk dengan 100 mL air kloroform P, menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan sisa yang larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1995:325).

b. Kadar sari larut etanol

Keringkan serbuk di udara, maserasi selama 24 jam 5,0 g serbuk dengan 100 mL etanol 95%, menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol 95%, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan sisa pada suhu 105° hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen yang larut etanol 95% (Depkes RI, 1995:325).

4.4.2. Pengujian Parameter Simplisia Non Spesifik

a. Kadar air

Kadar air simplisia ditetapkan dengan metode destilasi azeotrop. Disiapkan simplisia sebanyak ± 20 gram dan toluena jenuh 200 mL yang kemudian dimasukkan kedalam labu bundar dan dihubungkan dengan alat destilasi. Panaskan labu pada pemanas hingga toluena mendidih, atur

kecepatan tetesan hingga 4 tetes per detik dan tunggu hingga air pada tabung penerima konstan. Bilas bagian pendingin dengan toluena dan lakukan penyulingan kembali selama 5 menit. Setelah itu matikan pemanas dan tunggu hingga air dan toluena pada tabung terpisah sempurna (Depkes RI, 2000:16). Kadar air dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume air} \times \text{BJ air}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

b. Kadar abu total

Kurang lebih 2 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dalam desikator dan ditimbang (Depkes RI, 2000:17).

Kadar abu total dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{berat abu}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

c. Kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 mL HCl encer selama 5 menit, dan dikumpulkan abu yang tidak larut dengan menyaring pada kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas dan dipijarkan hingga bobot tetap, timbang (Depkes RI, 2000:17). Kadar abu tidak larut asam dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu tidak larut asam}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

d. Kadar abu larut air

Abu yang diperoleh dididihkan dengan 25 mL air selama 15 menit, dan dikumpulkan bagian yang tidak larut dengan menyaring pada kertas saring

bebas abu, cuci dengan air panas dan pijarkan selama 15 menit pada suhu tidak lebih dari 450°, hingga bobot tetap, timbang (Depkes RI, 1995:321).

4.5. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Salak

Ekstrak kulit salak dibuat dengan cara simplisia kulit buah salak diekstraksi secara remaserasi sebanyak 3x pada suhu kamar dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan simplisia dan pelarut (1:3) selama 4 hari. Maserat pertama ditampung setelah 48 jam dan dilakukan 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 yang diperoleh dapat dihitung dengan cara:

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

4.6. Pembuatan Sediaan dan Induksi Hiperkolesterolemia

4.6.1. Pembuatan suspensi ekstrak kulit buah salak

Dosis terendah ekstrak kulit buah salak adalah 210 mg/kg BB. Kemudian variasi dosis dilakukan 2x lipat dari dosis terendah sehingga didapatkan dosisnya yaitu 420 mg/kg BB dan 840 mg/kg BB. Kemudian di suspensikan dalam CMC-Na 1% hingga homogen dan diberikan secara oral dengan maksimal pemberian yaitu 1 mL/20 g BB.

4.6.2. Pembuatan suspensi pembanding

Dalam penelitian ini suspensi pembanding uji yang digunakan adalah obat simvastatin dosis 5 mg. Cara pembuatannya yaitu tablet simvastatin 5 mg dikonversikan ke dosis mencit, lalu ditimbang setara dengan 0,013 mg/20 g BB kemudian di suspensikan dalam CMC-Na 1%. Suspensi simvastatin tersebut diberikan secara oral maksimal pemberian yaitu 1 mL/20 g BB.

4.6.3. Pembuatan induksi hiperkolesterolemia

Pembuatan induksi hiperkolesterolemia secara eksogen dilakukan dengan pemberian diet tinggi lemak. Komposisi pakan diet tinggi lemak dalam 100 g terdiri dari kolesterol 6% kuning telur ayam, lemak kambing 10% dan minyak goreng 1%. Cara pembuatannya yaitu lemak kambing dipanaskan sampai cair. Kemudian lemak kambing yang telah di cairkan dan semua bahan yang telah ditimbang dicampurkan dengan pakan standar sampai homogen. Lalu dibuat menjadi massa padat (Phyto Medica, 1993: 38).

4.7. Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Swiss Webster jantan sebanyak 20 ekor berumur 2-3 bulan. Mencit dipilih karena relatif murah, mudah didapat, sangat mudah ditangani, bulu tidak kusam, peka terhadap rangsangan sekitar dan gesit. Hewan uji ditempatkan dalam kandang lalu diadaptasi selama 7 hari. Selama adaptasi hewan uji diberi makanan dan minuman secara *ad libitum*.

4.8. Perlakuan Hewan Uji

Pengujian hewan dilakukan sebanyak 4 kelompok tiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Kelompok tersebut terdiri dari kelompok uji I, uji II, uji III dan pembanding secara acak.

Kelompok I : diinduksi dengan DTL selama 21 hari kemudian selama 7 hari berikutnya diberikan suspensi ekstrak kulit buah salak dosis 210 mg/kg BB

Kelompok II : diinduksi dengan DTL selama 21 hari kemudian selama 7 hari berikutnya diberikan ekstrak kulit buah salak dosis 420 mg/kg BB

Kelompok III : diinduksi dengan DTL selama 21 hari kemudian selama 7 hari diberikan ekstrak kulit buah salak dosis 840 mg/kgBB

Kelompok IV : diinduksi dengan DTL selama 21 hari kemudian selama 7 hari berikutnya diberikan suspensi simvastatin 0,013 mg/20g BB

Setelah mencit diadaptasi, lalu dipuasakan selama 16 jam kemudian semua kelompok diinduksi dengan DTL dan waktu penginduksian dilakukan selama 21 hari. Setelah mencit diberikan induksi DTL selama 21 hari, diamati kenaikan kadar kolesterol. Kemudian diberikan suspensi ekstrak kulit buah salak pada kelompok II, III dan IV. Waktu pemberian ekstrak dilakukan selama 7 hari dan pemberian ekstrak melalui oral diberikan setiap hari.

4.9. Pengambilan Sampel Darah dan Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total

Sebelum sampel di ambil mencit dipuasakan dahulu selama 16 jam. Ekor mencit dibersihkan dengan alkohol 70%. Lalu pada bagian ujung ekor mencit

digunting kira-kira 2-4 mm. Kemudian dari pangkal hingga ujung ekor, diurut perlahan-lahan sampai darah keluar lalu sentuhkan ekor yang telah keluar darah tersebut ke alat *strip test* yang sebelumnya telah dimasukkan *strip* ke alat meter yang sudah menyala dan nomor kode pengecekan kolesterol sudah diatur. Sampel darah yang tersedot akan masuk ke dalam zona reaksi otomatis. Zona reaksi strip minimal menampung darah 10 μL , lalu ditunggu beberapa detik sampai hasil tes muncul. Pemeriksaan kadar kolesterol total dilakukan pada H_0 (sebelum induksi), kemudian H_{-7} , H_{-14} , H_{-21} (sesudah induksi) dan H_{-28} (sesudah terapi).

4.10. Analisa Data

Setelah data diperoleh dilakukan analisa data. Analisa data yang dilakukan adalah *paired sample t-test* untuk mengetahui signifikansi sesudah induksi dan sesudah terapi serta dilakukan analisis *Anova* dan uji lanjutan *LSD* untuk mengetahui perbedaan bermakna kadar kolesterol total antar kelompok dengan tingkat kepercayaan 90%.