

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1 Pengambilan Bahan

Kulit buah asam kandis diambil di daerah Pariaman, Sumatera Barat.

4.2 Determinasi Tumbuhan Asam Kandis

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel tumbuhan asam kandis (*Garcinia parvifolia* (Miq.) Miq.) yang dilakukan di Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Bogor.

4.3 Penapisan Fitokimia Simplisia

Penapisan fitokimia simplisia dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam suatu simplisia. Penapisan fitokimia terdiri dari pengujian alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, kuinon, polifenol, monoterpen dan seskuiterpen, triterpenoid dan steroid.

4.3.1 Uji alkaloid

Sampel ditambahkan dengan ammonia 25 % kemudian digerus dalam mortar, ditambahkan 20 mL kloroform dan digerus kuat-kuat. Campuran disaring dan filtrat digunakan untuk percobaan (Larutan A). Larutan A diteteskan pada kertas saring dan diberi pereaksi Dragendroff warna jingga yang timbul pada kertas saring menunjukkan alkaloid positif. Sisa larutan A dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan HCl 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 yang

terbentuk bertahan selama 15 menit dan hasil positif pada uji dengan pereaksi Dragendroff bila terbentuk endapan merah bata yang bertahan selama 15 menit (Farnsworth, 1966:245).

4.3.2 Uji flavonid

Sampel dicampur dengan serbuk magnesium dan HCl 2N. Campuran dipanaskan di atas tangas air, lalu disaring. Filtrat dalam tabung reaksi ditambahkan amil alkohol, lalu kocok kuat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol (Farnsworth, 1966:263).

4.3.3 Uji polifenol dan tanin

Sampel digerus dengan air hingga lumat, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dididihkan selama beberapa menit. Setelah disaring, filtrat dibagi dua bagian :

- Filtrat 1 : ke dalam filtrat 1 di teteskan FeCl_3 , terbentuknya warna biru hingga hitam menunjukkan adanya senyawa polifenol.
- Filtrat 2 : Ke dalam filtrat 2 ditetaskan larutan gelatin, lalu diamati terjadinya endapan dan gumpalan. Adanya golongan senyawa tanin ditandai dengan terbentuknya gumpalan. Endapan disaring, filtrat ditetesi dengan larutan FeCl_3 , terbentuknya warna hitam menandakan bahwa dalam senyawa tersebut terkandung tanin dan polifenol (Farnsworth, 1966:255,264).

4.3.4 Uji saponin

Sampel digerus dengan air hingga lumat, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah sedikit air dan dipanaskan. Setelah dingin dikocok

kuat beberapa menit hingga terbentuk busa. Adanya golongan saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang bertahan selama 5-10 menit serta tidak hilang pada penambahan satu tetes larutan HCl 0,1 N (Farnsworth, 1966:257).

4.3.5 Uji kuinon

Sejumlah kecil simplisia atau bahan uji lain ditempatkan dalam tabung reaksi, dipanaskan di atas penangas air lalu disaring. Larutan kalium hidroksida 5 % ditambahkan ke dalam filtrat dan timbulnya warna kuning hingga merah menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966:265).

4.3.6 Uji monoterpen dan seskuiterpen

Simplisia atau bahan uji lain digerus dengan eter, lalu dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan larutan vanillin 10 % dalam asam sulfat pekat. Warna hijau yang timbul menandakan positif senyawa mono dan seskuiterpen (Farnsworth, 1966:257-259).

4.3.7 Uji triterpenoid dan steroid

Simplisia atau bahan uji lain digerus dengan eter, lalu dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan larutan pereaksi Liebermann Burchard. Warna ungu yang timbul menandakan positif triterpenoid, sedangkan bila warna hijau-biru yang timbul menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1966:244-268).

4.4 Penyiapan Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) *Wistar* jantan yang berumur \pm 2-3 bulan dan sehat. Hewan

diadaptasikan selama jangka waktu 2 minggu. Kemudian selalu diamati kondisinya melalui penimbangan berat badan.

4.5 Pembuatan Larutan Uji

4.5.1 Penyiapan simplisia uji

Kulit buah asam kandis dipisahkan dari pengotor, kemudian dibersihkan dengan air mengalir, dikeringkan pada udara terbuka dan kena sinar matahari langsung. Pengeringan dilanjutkan dalam oven pada suhu 50°C kemudian diserbukkan menggunakan mesin penggiling.

4.5.2 Pembuatan ekstrak

Dalam penelitian ini ekstrak diperoleh dari ekstraksi cara dingin, yaitu maserasi. Serbuk kulit buah asam kandis ditimbang kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96 % dalam suhu kamar selama 3 hari dimana setiap hari maserat diambil lalu dilakukan remaserasi. Selanjutnya, maserat yang diperoleh dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* dan diuapkan dengan menggunakan *water bath* kemudian ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya dengan rumus berikut :

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

4.5.3 Pembuatan sediaan (Suspensi)

Ekstrak etanol kulit buah asam kandis, INH, rifampisin dan tablet yang mengandung temulawak ditimbang sesuai dengan dosis kelompok perlakuan yang diinginkan kemudian dilarutkan dalam CMC Na 0,5 % disesuaikan dengan volume maksimal yang bisa diberikan pada tikus. Stok sediaan uji yang dibuat tersebut selalu dibuat baru setiap hari, penyimpanan dalam kulkas.

4.6 Penentuan Dosis

Dosis INH yang digunakan pada penelitian ini adalah 189 mg/kg berat badan tikus. Dosis rifampisin yang digunakan pada penelitian ini adalah 189 mg/kgberat badan tikus. Dosis tablet pembandingmengandung *Curcuma xanthorrhiza* yang digunakan sebagai hepatoprotektor adalah 3,6 mg/kgBB.Dosis ekstrak etanol 96 % kulit buah asam kandis adalah 400 dan 800 mg/kgBB.

4.7 Pengelompokan Hewan

Sebelum dilakukan uji pada tikus, dilakukan aklimatisasi terhadap lingkungan minimal satu minggu. Suhu dan kelembaban relatif dari kandang harus diperhatikan karena hal tersebut dapat mempengaruhi uji penelitian. Sebelum perlakuan, semua tikus ditimbang untuk pengaturan dosis.

Pada penelitian digunakan tikus *Wistar* jantan yang kemudian dibagi secara acak kedalam 5 kelompok perlakuan berdasarkan dengan rumus Federer, yaitu (Federer, 1963) : $(t-1)(n-1) \geq 15$

Dimana t : jumlah kelompok perlakuan

n : jumlah ulangan tikus

Jumlah kelompok perlakuan yang digunakan adalah 5 ($t = 5$), maka :

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4$$

Kelompok I adalah kelompok kontrol negatif; kelompok II adalah kelompok kontrol positif yang diinduksi dengan INH dan rifampisin; kelompok

III dan IV adalah kelompok uji sedangkan kelompok V adalah kelompok pembanding.

Tabel IV.1 Pembagian kelompok hewan uji

No	Kelompok	Perlakuan
I	Kontrol Negatif (5 ekor)	Diberi suspensi CMC Na
II	Kontrol Positif (5 ekor)	Diinduksi dengan INH dan rifampisin secara oral dengan dosis masing-masing 189 mg/kg BB tikus dan 189 mg/kg BB tikus
III	Uji I (5 ekor)	Diinduksi INH dan Rifampisin lalu diberi suspensi ekstrak kulit buah asam kandis secara oral selama 12 hari dengan dosis 400 mg/kg BB tikus
IV	Uji II (5 ekor)	Diinduksi INH dan Rifampisin lalu diberi suspensi ekstrak kulit buah asam kandis secara oral selama 12 hari dengan dosis 800 mg/kg BB tikus
V	Pembanding (5 ekor)	Diinduksi INH dan Rifampisin lalu diberi suspensi yang mengandung <i>Curcuma xanthorrhiza</i> secara oral selama 12 hari dengan dosis 3,6 mg/kg BB tikus

Waktu penelitian adalah 27 hari yang terdiri dari 14 hari masa adaptasi, 12 hari masa induksi dan pemberian ekstrak dan 1 hari masa pengumpulan sampel darah. Dua minggu pertama masing-masing kelompok diadaptasikan. 12 hari berikutnya, kelompok I (kontrol negatif/normal) diberikan suspensi CMC Na; kelompok II (kontrol positif) diberi induksi isoniazid 189 mg/kgBB tikus dan rifampisin 189 mg/kgBB tikus secara oral; kelompok III dan IV (uji/perlakuan) diberi induksi isoniazid 189 mg/kgBB tikus dan rifampisin 189 mg/kgBB tikus kemudian 2 jam berikutnya diberikan sediaan uji (suspensi) ekstrak etanol 96 % kulit buah asam kandis dengan dosis masing-masing 400 dan 800 mg/kgBB melalui sonde oral. Dan kelompok V (pembanding) diberi induksi isoniazid 189 mg/kgBB tikus dan rifampisin 189 mg/kgBB tikus kemudian 2 jam berikutnya

diberikan suspensi yang mengandung temulawak dengan dosis 3,6 mg/kgBB tikus.

4.8 Pengambilan Darah dan Pengumpulan Serum

Pengambilan darah dilakukan melalui ekor tikus. Darah ditampung dalam tabung reaksi eppendorf dan didiamkan selama 15 menit kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, serum yang sudah terpisah dari endapan kemudian diambil dengan pipet 100 μ L.

4.9 Penentuan Aktivitas ALT

Pengujian aktivitas ALT pada hewan uji dilakukan secara fotometrik. Panjang gelombang 340 nm, tebal kuvet 1 cm pada temperatur 30⁰C. Ke dalam tiap tabung reaksi, dimasukkan reagen dengan urutan dan volume sebagai berikut:

Tabel IV.2 Prosedur pengukuran aktivitas ALT serum

Urutan	Penambahan Pereaksi	Uji	Blanko
1	Larutan pereaksi	1000 μ L	1000 μ L
2	Aquadest	-	10 μ L
3	Serum	100 μ L	-

Sampel diukur serapannya dengan menggunakan reagen sebagai blankonya. Pengukuran sampel dilakukan pada panjang gelombang 340 nm selama 3 menit dengan mencatat serapan pada setiap menit.

Penetapan aktivitas ALT (U/L) 30⁰C = ΔA /menit \times faktor konversi

Aktivitas ALT yang dihitung dinyatakan dalam Unit/Liter dan dihitung pada masing-masing kelompok tikus. Makin kuat daya hepatoprotektor bahan uji, makin besar kemampuan untuk menurunkan aktivitas aminotransferase. Semakin tinggi kadar ALT maka akan semakin tinggi tingkat kerusakan hati.

4.10 Pengolahan Data

Untuk mengetahui keberhasilan induksi dilakukan perbandingan secara statistik antara kadar ALT kontrol positif dan kontrol negatif. Untuk mengetahui adanya efek hepatoprotektif dilakukan perbandingan secara statistik pada data kadar ALT yang diperoleh antara kelompok uji dengan kelompok kontrol positif dan pembanding. Uji statistik dilakukan dengan metode ANOVA dengan aras kepercayaan 90 %. Menggunakan software SPSS versi 18.0

