

## **BAB IV**

### **PROSEDUR KERJA**

#### **4.1. Pengumpulan dan Determinasi Tanaman**

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba seledri (*Apium graveolens* L.) yang diperoleh dari perkebunan Balai Penelitian Tanaman Sayuran (BALITSA), Lembang. Determinasi dilakukan di Herbarium Jatinangor Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Jurusan Biologi Universitas Padjajaran, untuk memastikan identitas tanaman yang digunakan.

#### **4.2. Penyiapan Simplisia**

Herba seledri setelah dibersihkan dari debu dan kotoran yang melekat lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di tempat yang tidak terkena matahari secara langsung agar kandungan bahan aktif tidak mudah rusak. Setelah kering digiling dengan mesin penggiling sehingga diperoleh serbuk simplisia.

#### **4.3. 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.

### 4.3.1 Uji Flavonoid

Sejumlah 1 gram bahan digerus dalam mortir dengan 100 ml air panas, pindahkan ke dalam tabung reaksi lalu masukan serbuk magnesium, HCl 2 N, seluruh campuran di didihkan selama 5-10 menit. Setelah itu saring campuran dan dibiarkan dingin lalu ditambahkan amil alkohol kepada filtrat, lalu dikocok kuat-kuat dan dibiarkan memisah. Dengan terbentuknya warna kuning hingga merah muda pada lapisan amil alkohol menandakan adanya senyawa flavonoid (Farnsworth, 1966: 262-264).

### 4.3.2 Uji Alkaloid

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia di tempatkan ke dalam mortir, dibasakan dengan amonia sebanyak 5 ml, kemudian di tambahkan 20 ml kloroform dan di gerus kuat-kuat. Campuran di saring dan filtrat digunakan untuk percobaan (Larutan A). Larutan A diteteskan pada kertas saring lalu di beri pereaksi Dragendorf. Alkaloid positif di tunjukan dengan timbulnya warna jingga pada kertas saring. Filtrat ditempatkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan HCl 1 N, campuran dikocok lalu dibiarkan hingga terjadi pemisahan fase. Lalu lapisan air atau fraksi asam nya dipisahkan (Larutan B). Masing-masing 5 ml larutan B dalam tabung reaksi di uji dengan pereaksi mayer. Hasil positif jika terdapat endapan putih yang terbentuk bertahan selama 15 menit. Lalu hasil positif pada pereaksi Dragendorf ditunjukan dengan terbentuknya endapan berwarna merah bata yang bertahan selama 15 menit (Farnsworth, 1966: 245-257).

### 4.3.3 Uji Saponin

Bahan digerus dengan air hingga lumat, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan lagi sedikit air dan dipanaskan. Setelah dingin, tabung dikocok vertikal selama 10 detik kemudian biarkan selama 10 menit. Pembentukan buih atau busa diamati. Bila terjadi pembentukan buih atau busa setinggi minimal 1 cm dan bertahan selama 5-10 menit menunjukkan adanya saponin. Busa ditambahkan dengan HCl 2 N beberapa tetes. Apabila busa hilang maka menunjukkan bahwa tidak terdapat saponin (Farnsworth, 1966: 257-260).

### 4.3.4 Uji Tanin

Sejumlah 1 gram bahan digerus dalam mortir dengan 100 ml air panas, dididihkan selama 5-10 menit kemudian dibagi menjadi tiga. Pada tabung pertama ditambahkan dengan  $\text{FeCl}_3$  akan terbentuk warna hijau, violet, hitam menunjukkan adanya fenol. Kedua ditambahkan dengan gelatin menunjukkan adanya tanin dengan terbentuknya endapan putih. Ketiga ditambahkan dengan pereaksi steasny endapan berwarna merah muda yang terbentuk menunjukkan adanya tanin katekat. Hasil dari bagian ketiga di saring. Kemudian filtratnya ditambahkan dengan natrium asetat dan  $\text{FeCl}_3$  endapan baru yang terbentuk menunjukkan adanya tanin galat (Farnsworth, 1966: 264-265).

### 4.3.5 Uji Kuinon

Bahan digerus dengan air. Saring melalui kapas. Kepada filtrat ditetaskan larutan basa kuat (NaOH atau KOH). Terjadinya warna merah menunjukkan bahwa dalam simplisia atau bahan yang diuji terdapat senyawa golongan kuinon (Farnsworth, 1966: 265-266).

#### 4.3.6. Uji Polifenolat

Sebanyak 1 gram simplisia di tempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya. Kemudian panaskan dan disaring. Kepada filtrat ditambahkan larutan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  timbulnya warna hijau atau biru-hijau, merah-ungu, biru-hitam hingga hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1966: 264-265).

#### 4.3.7. Uji Steroid dan Terpenoid

Tiga spatel simplisia serbuk digerus dengan eter kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan pereaksi Libermann Burchard dan apabila timbul warna merah ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan apabila timbul warna hijau biru menandakan positif steroid (Farnsworth, 1966: 266-267).

#### 4.3.8. 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 seskuiterpen (Depkes RI, 1977: 132)

#### 4.4. Penetapan Parameter Standar Simplisia dan Ekstrak

##### 4.4.1. Kadar sari larut air

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air dan 10 tetes kloroform LP menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama enam jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam lalu disaring. Sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara, kemudian sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam air dinyatakan dalam persen (%), dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara. Kadar sari larut air dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{berat sari larut air (gram)}}{\text{berat bahan awal (gram)}} \times 100\% \quad (1)$$

(DepKes RI, 2000: 31)

##### 4.4.2 Kadar sari larut etanol

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol (95%) menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama enam jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam lalu disaring dengan cepat untuk menghindari penguapan etanol. Sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara, kemudian sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol dinyatakan dalam persen (%) dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara. Kadar sari larut etanol dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{berat sari larut etanol (gram)}}{\text{berat bahan awal (gram)}} \times 100\% \quad (2)$$

(DepKes RI, 2000: 31-32)

#### 4.4.3. 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 masuk an 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 peyulingan 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:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume air} \times 9 \text{ air}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \quad (3)$$

#### 4.4.4. Bobot Jenis

Uji ini dilakukan untuk parameter ekstrak, tahapan pengukuran bobot jenis dimulai dengan penimbangan piknometer kosong (W1) kemudian diisi dengan aquadest hingga penuh dan ditutup. Bagian luar piknometer dilap sampai kering kemudian ditimbang (W2). Aquadest dikeluarkan dari piknometer dan dikeringkan, selanjutnya piknometer diisi dengan ekstrak dan ditimbang kembali (W3) (Depkes RI, 2000:14).

#### 4.5. Penyiapan Sediaan Uji

##### 4.5.1. Penyiapan Ekstrak

Serbuk simplisia herba seledri diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol selama 24 jam dan diulangi sebanyak 3 kali. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C, hingga diperoleh ekstrak. Penguapan kemudian dilanjutkan dengan menggunakan penangas air hingga diperoleh ekstrak kental, persen rendemen ekstrak dihitung dengan rumus:

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak (gr)}}{\text{bobot simplisia (gr)}} \times 100\% \quad (4)$$

##### 4.5.2. Pembuatan sediaan uji

Dibuat ekstrak herba seledri dengan dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB, kemudian disuspensikan dengan CMC Na 0,5%.

##### 4.5.3. Pembuatan sediaan pembanding

Tablet natrium dikofenak dihaluskan hingga menjadi serbuk kemudian diambil sebagian sesuai dengan dosis hewan uji, kemudian disuspensikan dengan CMC Na 0,5%.

#### 4.6. Pengujian Aktivitas Antiinflamasi

Tikus di aklimasi selama 2 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 25 tikus Wistar jantan, tikus dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kontrol, kelompok Ekstrak Etanol Herba Seledri (EEHS) dosis 1, kelompok EEHS dosis 2, kelompok EEHS dosis 3, dan kelompok pembanding natrium diklofenak. Semua kelompok masing-masing diberi perlakuan sebagai berikut.

Kelompok kontrol : Tikus diberi suspensi CMC Na 0,5 % secara oral.

Kelompok EEHS dosis 1 : Tikus diberi suspensi ekstrak etanol herba seledri 100 mg/kg bb secara oral.

Kelompok EEHS dosis 2 : Tikus diberi suspensi ekstrak etanol herba seledri 200 mg /kg bb secara oral.

Kelompok EEHS dosis 3: Tikus diberi suspensi ekstrak etanol herba seledri 400 mg /kg bb secara oral.

Kelompok pembanding : Tikus diberikan suspensi Natrium diklofenak 4,5 mg/kg bb secara oral.

Setelah diberikan sediaan pada masing-masing kelompok, hewan uji didiamkan 30 menit lalu diinduksi karagenan 1% secara intraplantar pada masing-masing kelompok kecuali kelompok kontrol negatif. Selanjutnya masing-masing kelompok dilakukan pengukuran kaki tikus selama 8 jam dengan pletismometer.

#### **4.6.1 Pengukuran Volume Udem**

Tikus dipuasakan  $\pm 18$  jam sebelum pengujian air minum tetap diberikan. Volume kaki kiri tikus diukur dengan cara mencelupkan kaki tikus sampai tanda batas pada kakinya kedalam alat pletismometer untuk setiap selang waktu 1 jam



selama 8 jam setelah penyuntikan suspensi karagenan ( jam ke 1,2,3,4,5,6,7,8 dan ke 24).

#### **4.7. Analisis Data**

Setelah pengukuran volume udem kaki kiri tikus, dilakukan analisis data metode T student dan uji normalitas dilanjutkan ANOVA dan LSD untuk melihat perbedaan bermakna secara statistik dari aktivitas antinflamasi antar kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok uji, dan kelompok pembanding.

