

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Pengambilan Sampel Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian yaitu daun dan buah asam jawa diperoleh dari Indramayu kec. Sindang selanjutnya dilakukan determinasi di Hebarium Bandung Sekolah Tinggi Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung (ITB) untuk memastikan bahwa benar tanaman yang digunakan jenis *Tamarindus indica* (L.).

4.2. Pembuatan Ekstrak Sediaan Uji

Ekstrak dibuat dengan cara maserasi. Simplisia daun dan buah asam jawa ditimbangan masing-masing sebanyak 1000 gram kemudian dimaserasi dengan etanol 95% dalam suhu kamar selama 3 hari, dimana setiap 24 jam maserat diambil lalu dilakukan remaserasi. Selanjutnya maserat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan diuapkan dengan penangas air. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dihitung randemennya dengan rumus berikut :

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

4.3 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia simplisia dan ekstrak daun dan buah asam jawa (*Tamarindus indica* L) dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam suatu ekstrak. Penapisan fitokimia terdiri dari pengujian alkaloid,

flavonoid tannin, saponin, kuinon, polifenol, triterpenoid dan steroid, monoterpen dan seskuiterpen.

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 filtrate 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).

4.3.2. Uji flavonoid

Sampel dicampur dengan serbuk magnesium dan HCl 2N. Campuran dipanaskan di atas tangas air, lalu disaring. Ke dalam 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).

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).

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).

4.3.5. Uji kuinon

Sampel digerus dengan air kemudian disaring dengan kapas. Filtrat ditetesi dengan NaOH atau KOH 5%. Adanya senyawa kuinon ditandai dengan terbentuknya warna merah (Depkes RI, 1989).

4.3.6. Uji triterpenoid dan steroid

Sampel digerus dengan eter kemudian dipipet melalui kapas dengan penyaringan lalu diuapkan hingga kering. Pada residu ditetaskan larutan Lieberman-Burchard. Adanya golongan triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu, sedangkan warna hijau menunjukkan adanya senyawa steroid (Depkes RI, 1989).

4.3.7. Monoterpen dan sesquiterpen

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 vanilin 10% dalam asam sulfat pekat dan apabila timbul warna-warna menandakan positif senyawa monoterpen dan sesquiterpen

4.4 Parameter non-spesifik

4.4.1 Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dikerjakan dengan cara dibersihkan tabung penerima dan pendingin dengan asam pencuci, kemudian dibilas dengan air, dikeringkan dalam lemari pengering. Ke dalam labu kering dimasukkan sejumlah simplisia ditimbang sebanyak 25 gram. Zat yang dapat menyebabkan gejalok ditambahkan batu didih ke dalam labu tersebut dimasukkan lebih kurang 200 mL toluena, kemudian alat dihubungkan. Toluena jenuh dituangkan ke dalam tabung penerima melalui alat pendingin (n). Labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluena mulai mendidih, disuling dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes tiap detik hingga sebagian air tersuling. Kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluena, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan dengan kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluena, penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima dibiarkan mendingin hingga suhu kamar. Jika ada tetes air yang melekat pada pendingin tabung penerima, digosok dengan karet yang diikat pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluena

hingga tetesan air turun. Setelah air dan toluena memisah sempurna, dibaca volume air dengan ketelitian 0,05 mL. Kadar air dihitung dalam persen (%) dengan persamaan:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{volume air (mL)} \times \text{BJ air (g/mL)}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

(Depkes RI, 2000:

14).

4.5. Pembuatan induktor karagenan

Induktor karagenan dibuat dengan cara menimbang 50 mg karagenan, kemudian ditambahkan 5 mL larutan NaCl 0,9% lalu diaduk sampai homogen. Selanjutnya, induktor karagenan yang telah dibuat dimasukkan kedalam *inkubator* selama 24 jam pada suhu 37⁰C.

4.6. Penyiapan Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus jantan wistar yang berumur 2-3 bulan dan sehat (bulu bersih, tidak ada luka, bergerak aktif). Hewan diadaptasikan selama jangka waktu 2 minggu. Kemudian selalu diamati kondisinya melalui penimbangan berat badan dengan bobot 180 - 250 gram.

4.7. Pengujian antiinflamasi

Hewan uji terlebih dahulu dikelompokkan, pengelompokan dilakukan secara acak sebanyak 36 ekor tikus jantan dibagi menjadi 7 kelompok yang masing-masing kelompok sebanyak 6 tikus. Tikus jantan diadaptasikan selama 2 minggu untuk mencegah hewan uji menjadi stress. Hewan uji dipuasakan selama

18 jam tetapi tetap diberikan minum. Kaki tikus setiap kelompok ditandai pada bagian kaki dengan spidol permanent secara melingkar, lalu ukur volume awal kaki normal dengan mencelupkan kaki tikus sampai batas kaki yang sudah ditandai ke dalam air raksa pada alat pletismometer dan catat angka yang dicapai oleh air raksa pada skala (V_0). Lalu diberikan pemberian sediaan sesuai dengan masing-masing kelompok.

1. Kelompok 1 : kontrol positif diberi suspensi CMC Na 0,5% induksi karagenan 1%.
2. Kelompok 2 : kontrol negatif diberi suspensi CMC-Na 0,5% induksi NaCl 0,9%.
3. Kelompok 3 : Uji dengan ekstrak etanol 95% daun asam jawa dosis 1000 mg/kg bb.
4. Kelompok 4 : Uji dengan ekstrak etanol 95% buah asam jawa dosis 400 mg/kg bb.
5. Kelompok 5 : uji dengan kombinasi ekstrak etanol 95% (daun asam jawa dosis 500 mg/kgBB dan buah asam jawa 200mg/kgBB)
6. Kelompok 6 : Perbandingan Natrium diklofenak dosis 2,25 mg/kgBB.
7. Kelompok 7 : Perbandingan Natrium diklofenak dosis 4,5 mg/kgBB.

Selanjutnya setiap 1, 2, 3, 4, 5, 24, dan 30 jam setelah pemberian sediaan pada masing-masing kelompok dilakukan pengukuran kaki tikus dengan pletismometer (V_t).

Hitung volume udem dengan rumus :

$$V_u = V_t - V_0$$

Keterangan : V_u : Volume udem kaki setiap waktu pengamatan
 V_t : Volume kaki setelah induksi karagenan 1% pada waktu t

V_0 : Volume kaki sebelum induksi karagenan 1%

4.8. Teknik Analisis Data

Untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan bermakna terhadap terjadinya aktivitas antiinflamasi pada kelompok uji dengan kontrol dan kelompok pembanding dengan kelompok kontrol maka dilakukan uji statistik yaitu metode, uji normalitas, T-student, ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95 %, dilanjutkan LSD , %inhibisi. Dengan teknik analisis data tersebut, maka dapat dirumuskan suatu hipotesis sebagai berikut :

1. Perbandingan aktivitas antiinflamasi

H_{01} : Tidak ada perbedaan aktivitas antiinflamasi yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok yang diberikan suspensi ekstrak etanol daun dan buah asam jawa.

H_{a1} : Ada perbedaan aktivitas antiinflamasi yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok yang diberikan ekstrak etanol daun dan buah asam jawa.

2. Korelasi peningkatan dosis ekstrak dengan aktivitas antiinflamasi

H_{02} : Tidak ada hubungan antara pemberian dosis tunggal dan kombinasi suspensi ekstrak etanol daun dan buah asam jawa.

H_{a1} : Ada hubungan antara pemberian dosis tunggal dan kombinasi suspensi ekstrak etanol daun dan buah asam jawa.