

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Penyiapan bahan uji

Tahapan penyiapan bahan uji meliputi pengumpulan bahan dimana tanaman yang akan digunakan adalah daun salam *Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp dan daun jambang *Syzygium cumini* (L.) Skeels segar yang diperoleh dari Kabupaten Subang. Sebelum dilakukan penelitian terhadap tumbuhan, terlebih dahulu dideterminasi tanaman salam dan tanaman jambang yang bertujuan untuk mengidentifikasi kebenaran tanaman. Determinasi dilakukan di Herbarium Bandung, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB, Bandung.

Pengolahan bahan meliputi sortasi basah dengan cara memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lain dari tanaman seperti tanah, kerikil, rumput dan pengotor lainnya. Pencucian dengan air bersih untuk menghilangkan tanah atau kotoran yang melekat pada tanaman. Bahan tanaman dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Kemudian dirajang hingga menjadi simplisia.

4.2. Penapisan fitokimia

Prosedur penapisan fitokimia yang digunakan menurut (Farnsworth, 1996:245-266) meliputi uji alkaloid, uji flavonoid, uji polifenol dan tanin, uji kuinon, uji steroid dan triterpenoid, uji saponin, uji monoterpenoid dan seskuiterpenoid.

4.2.1. Uji alkaloid

Sampel ditambahkan dengan amonia 25% kemudian digerus dalam mortar, ditambah 20 ml kloroform dan digerus dengan kuat. Campuran disaring dan filtrat digunakan untuk percobaan (Larutan A). Larutan A diteteskan pada kertas saring dan diberi pereaksi Dragendorff. Warna jingga yang timbul pada kertas saring menunjukkan alkaloid positif. Sisa larutan A diekstraksi dua kali dengan 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 Dragendorff bila terbentuk endapan merah bata yang bertahan selama 15 menit.

4.2.2. Uji flavonoid

Sampel dicampur dengan serbuk magnesium dan HCl 2N. Campuran dipanaskan diatas 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.

4.2.3. Uji polifenol dan tanin

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

Filtrat 1: ke dalam filtrat satu diteteskan larutan pereaksi besi (III) klorida. Adanya warna biru hingga hitam menunjukkan adanya senyawa golongan polifenol.

Filtrat 2: ke dalam filtrat dua diteteskan larutan gelatin, lalu diamati terjadinya pengendapan atau penggumpalan. Adanya penggumpalan menunjukkan bahwa dalam filtrat terkandung senyawa golongan tanin. Endapan gelatin disaring. Filtrat ditetesi larutan pereaksi besi (III) klorida. Bila terbentuk warna hitam, berarti bahwa dalam bahan tersebut terkandung golongan tanin dan polifenol.

4.2.4. Uji kuinon

Sebanyak 10 ml larutan A (air + sampel lalu dipanaskan dan disaring) dalam tabung reaksi ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1N. Adanya kuinon ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah.

4.2.5. Uji steroid dan triterpenoid

Sampel ditambahkan eter, dipipet sambil disaring dan filtratnya diuapkan. Residunya ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Jika terbentuk warna biru hijau, positif steroid dan jika terbentuk warna merah-ungu menunjukkan adanya triterpenoid.

4.2.6. Uji saponin

Sebanyak 10 ml larutan A (air + sampel lalu dipanaskan dan disaring) dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dikocok vertikal selama 10 detik. Jika busa dengan tinggi 1 cm stabil selama 10 menit, maka pengujian dilanjutkan dengan menambahkan 2 tetes HCl 2N. Jika busa tersebut tetap tidak hilang maka di dalam simplisia terkandung saponin.

4.2.7. Uji monoterpenoid dan seskuiterpenoid

Sampel ditambahkan eter, dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Ke dalam

hasil filtrat di tambahkan larutan vanilin 10% dalam asam sulfat pekat. Terjadi warna-warna menunjukkan senyawa mono dan seskui-terpenoid.

4.3. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode Azeotroph, yaitu tabung penampung dan kondensor dibilas dengan air kemudian dikeringkan dalam oven. Lalu 200 ml toluena yang telah dijenuhkan dengan akuadest dimasukkan ke dalam labu destilasi. Sejumlah simplisia sebanyak 25 g dimasukkan ke dalam labu bundar. Labu didihkan perlahan-lahan selama kurang lebih 15 menit dan ditambahkan serpihan porselen. Setelah mendidih, campuran kemudian disuling dengan kecepatan 2 tetes/detik hingga sebagian besar air tersuling lalu kecepatan penyulingan dinaikkan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam kondensor dibilas dengan toluena. Selanjutnya dilakukan penyulingan selama 5 menit, kemudian pemanasan dihentikan. Tabung penerima didinginkan sampai suhu kamar. Tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima dihilangkan. Air dan toluena dibiarkan memisah dalam tabung penerima, volume air dalam tabung penerima diamati dan kadar air dalam persen dapat dihitung (Depkes RI, 2000).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{ml air} \times \text{bobot jenis air}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

4.4. Penetapan kadar abu

Lebih kurang dua sampai tiga gram simplisia dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan, ditara dan diratakan. Krus porselin dipijar pada suhu 600°C kemudian didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara. (Depkes RI, 2000).

4.5. Penyiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus galur wistar jantan dengan berat badan berkisar 120-200 gram sebanyak 30 ekor. Tikus-tikus ini diaklimatisasi selama 14 hari dalam kandang hewan, diberi pakan standar dan air minum secukupnya. Tujuannya yaitu agar tikus dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan baru dan mengurangi stres pada tikus. Selama masa penyesuaian ini, dilakukan pengamatan keadaan umum dan penimbangan untuk melihat tikus sehat yang selanjutnya akan digunakan pada penelitian.

4.6. Pembuatan ekstrak

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 500 g simplisia salam dan 300 g simplisia jambang kemudian dimaserasi dalam etanol 96%. Ke dalam maserator, dimasukkan satu bagian serbuk dan sepuluh bagian etanol 96%. Bagian atas maserator ditutup untuk menghindari penguapan pelarut, dan dibiarkan selama 24 jam. Maserat dipisahkan kemudian diulangi proses tersebut dengan jumlah simplisia dan pelarut yang sama. Semua maserat dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan kecepatan 30 rpm untuk menguapkan pelarut

(etanol) hingga diperoleh ekstrak yang kental. Ekstrak yang diperoleh ditimbang, kemudian rendemen ekstrak dihitung dan dinyatakan dalam persen, dengan rumus sebagai berikut (Harbone, 1996) :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\% \quad (2)$$

4.7. Penentuan dosis sediaan uji

Dosis sediaan uji ditentukan berdasarkan dosis yang mengacu pada jurnal daun salam dan daun jambang pada penurunan asam urat. Dilihat dari penelitian yang telah dilakukan pada daun salam dengan dosis 3 g/kg BB (Filadelfia, Agnes Sinega et al.,2014), daun jambang dengan dosis 1,5 mg/20 g BB mencit (Rukmana, Dipta.,2010) yang sudah dikonversikan menjadi 52,5 mg/kg BB tikus dan dosis kombinasi setengah dari masing-masing dosis salam dan jambang.

4.8. Pembuatan sediaan uji

Perhitungan berat ekstrak yang dibutuhkan untuk sekali pemberian dilakukan sesuai dengan bobot badan masing-masing tikus. Berat ekstrak selanjutnya disuspensikan dengan Na CMC (*natrium carboxymethylcellulose*) 0,5%. CMC Na dipilih karena dapat larut di air selain itu Na-CMC akan terdispersi dalam air, kemudian butir-butir Na-CMC yang bersifat hidrofilik akan menyerap air dan terjadi pembengkakan.

4.9. Pembuatan suspensi allopurinol

Dosis lazim allopurinol pada manusia adalah 100 mg per hari. Dosis allopurinol untuk tikus didapatkan dari perkalian faktor konversi manusia ke tikus yaitu 0,018. Maka berdasarkan perhitungan dosis untuk tikus adalah 1,8 mg/200 g bb. Pembuatan sediaan dilakukan dengan mensuspensikannya pada Na CMC 0,5%.

4.10. Pembuatan sediaan kalium oksonat

Agar dapat membuat kondisi hiperurisemia pada hewan uji, dosis kalium oksonat yang diberikan adalah 250 mg/kg bb (Osada, *et al.*, 1993:183-188).

4.11. Perlakuan

Pada penelitian ini, hewan uji yang digunakan yaitu sebanyak 30 ekor tikus jantan yang dibagi ke dalam 6 kelompok perlakuan secara acak. Kelompok I merupakan kelompok negatif yang hanya diberi Na CMC 0,5%, kelompok II merupakan kelompok positif yang diberikan induksi kalium oksonat tanpa diobati, serta kelompok III yang merupakan kelompok pembanding yang diberi allopurinol. Sedangkan kelompok IV, V dan VI merupakan kelompok uji berturut-turut dengan diberikan daun salam, daun jambang dan kombinasi keduanya. Pada hari ke-1 pada semua kelompok, sebelum diberikan sediaan dilakukan pengukuran kadar asam urat awal (t_0). Setelah itu semua kelompok diberikan sediaan secara per oral selama 7 hari sesuai dengan kelompoknya. Pada hari ke-8 pada semua kelompok dilakukan pengukuran kadar asam urat yang kedua pengukuran kadar

asam urat sebelum induksi (t1). Kelompok II, III, IV, V dan VI diinduksi dengan kalium oksonat secara intraperitoneal sedangkan kelompok I merupakan kontrol negatif hanya diinjeksikan Na CMC 0,5% secara intraperitoneal juga. Dua jam setelah induksi, darah tikus diambil untuk dilakukan pengukuran kadar asam urat setelah induksi (t2). Kemudian diberikan sediaan lagi pada semua kelompok sesuai dengan kelompoknya masing-masing. Dua jam setelah pemberian sediaan dilakukan pengukuran kadar asam urat yang terakhir untuk melihat adanya penurunan (t3).

4.12. Pengambilan darah

Pengambilan darah dilakukan melalui ekor tikus dengan membersihkan terlebih dahulu ekor tikus dengan etanol. Kemudian bagian ujung ekor tikus dilukai dengan menggunakan *cutter*, darah yang keluar kemudian diteteskan ke dalam test strip asam urat.

4.13. Penentuan kadar asam urat

Kadar asam urat diukur dengan menggunakan *blood uric acid meter*. Darah yang diperoleh dari bagian ujung ekor tikus yang dilukai kemudian diteteskan ke dalam test strip asam urat dan dalam 15 detik kadar asam urat akan muncul pada layar. Nilai yang tercantum di layar menunjukkan kadar asam urat dalam mg/dl.

4.14. Analisis data

Dari nilai kadar asam urat yang diperoleh untuk masing-masing sediaan, dilakukan kesetaraan aktivitas sediaan uji dengan antihiperurisemia pembanding. Selanjutnya dilakukan uji statistika *T-Student*, *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan uji lanjut *Least Significant Difference* (LSD).

