

## **BAB IV**

### **PROSEDUR KERJA**

#### **4.1. Pengumpulan Bahan dan Determinasi Tumbuhan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bidara upas yang diperoleh dari daerah Kediri, Jawa Timur. Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

#### **4.2. Pengolahan dan Pembuatan Simplisia**

Daun bidara upas yang telah dikumpulkan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang masih melekat. Proses selanjutnya dilakukan perajangan dan pengeringan bahan, lalu dimasukkan ke dalam lemari pengering pada suhu sekitar 40 °C. Simplisia yang sudah kering disimpan dalam wadah tertutup rapat dan dihaluskan.

#### **4.3. Pemeriksaan Makroskopik dan Mikroskopik**

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap daun bidara upas dan serbuk simplisia kering yang meliputi ukuran, warna dan bentuk daun. Sedangkan pengamatan mikroskopik dilakukan terhadap sayatan melintang dari daun dan serbuk simplisia daun bidara upas menggunakan beberapa tetes air, iodium kalium iodida ( $I_2KI$ ), fluoroglucinol, HCl dan kloralhidrat untuk melihat fragmen-fragmen jaringan daun seperti epidermis, mesofil, rambut (trikoma), jaringan

pembuluh, kelenjar lateks (getah), dan karakteristik penanda lainnya dari daun bidara upas.

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

##### **4.4.1. Penetapan organoleptik**

Parameter organoleptik simplisia dilakukan dengan menggunakan panca indera untuk mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa (Depkes. RI, 2000:31).

##### **4.4.2. Penetapan kadar sari larut air dan etanol**

###### **a. Penetapan kadar sari larut air**

Sebanyak 5 gram simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL campuran air-kloroform menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama, dibiarkan selama 18 jam lalu disaring dan 20 mL filtratnya diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara. Sisanya (residu) kemudian dipanaskan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air dihitung terhadap ekstrak awal dengan cara (Depkes. RI, 2000:31):

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{Berat sari larut air (g)}}{\text{Berat bahan awal (g)}} \times \frac{100}{20} \times 100\% \quad (4)$$

###### **b. Penetapan kadar sari larut etanol**

Sebanyak 5 gram simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol (95%) menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama, dibiarkan selama 18 jam lalu disaring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol. Sebanyak 20 mL filtratnya kemudian diuapkan

hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara. Selanjutnya sisa (residu) dipanaskan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol (95%) dihitung terhadap ekstrak awal dengan cara (Depkes. RI, 2000:31):

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{Berat sari larut etanol (g)}}{\text{Berat bahan awal (g)}} \times \frac{100}{20} \times 100\% \quad (5)$$

#### 4.4.3. Penetapan susut pengeringan

Krus porselen bertutup ditara dan dipanaskan pada suhu 105 °C selama 30 menit, lalu sebanyak 1-2 gram simplisia ditimbang, dimasukkan ke dalam krus dan permukaan atasnya diratakan hingga memiliki ketebalan 5-10 mm dengan cara menggoyangkan krus. Selanjutnya krus dimasukkan ke dalam lemari pengering dalam keadaan terbuka (tutup dibuka) dan dikeringkan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Setiap dilakukan pengeringan, maka sebelumnya krus harus dibiarkan dalam keadaan tertutup dan mendingin dalam eksikator pada suhu kamar. Susut pengeringan dapat dihitung dengan cara (Depkes. RI, 2000:13):

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{Berat zat yang hilang (g)}}{\text{Berat zat awal (g)}} \times 100\% \quad (6)$$

#### 4.4.4. Penetapan kadar abu total

Sebanyak 2-3 gram simplisia yang telah digerus, ditimbang, dan dimasukkan dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian diratakan, dipijarkan perlahan sampai arang habis, didinginkan, lalu ditimbang. Jika arang tidak dapat dihilangkan, maka ditambahkan air panas, disaring melalui kertas saring bebas abu. Sisa abu pada kertas saring dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan, dipijarkan hingga bobot tetap,

dan ditimbang. Kadar abu dapat dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes. RI, 2000:17):

$$\text{Kadar Abu Total} = \frac{\text{Berat abu (g)}}{\text{Berat bahan awal (g)}} \times 100\% \quad (7)$$

#### 4.4.5. Penetapan kadar abu yang tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu dididihkan dengan 25 mL asam sulfat encer P selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan dan disaring melalui kertas saring bebas abu, lalu dicuci dengan air panas, dipijarkan hingga bobot tetap, dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah di keringkan di udara dengan cara (Depkes. RI, 2000:17):

$$\text{Kadar abu total tidak larut asam} = \frac{\text{Berat abu tidak larut asam (g)}}{\text{Berat bahan awal (g)}} \times 100\% \quad (8)$$

#### 4.4.6. Penetapan bobot jenis

Piknometer dibersihkan, dikeringkan, dan dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25 °C lalu diatur hingga suhu ekstrak cair ± 20 °C dan dimasukkan ke dalam piknometer. Suhu piknometer yang telah diisi diatur hingga suhu 25 °C, lalu kelebihan ekstrak cair dibuang dan ekstrak cair ditimbang. bobot jenis dapat dihitung dengan cara (Depkes. RI, 2000:14):

$$\text{Bobot Jenis} = \frac{W3 (g) - W1 (g)}{W2 (g) - W1 (g)} \quad (9)$$

**Keterangan:**

W1 = Bobot Piknometer Kosong

W2 = Bobot Piknometer + Aquadest

W3 = Bobot Piknometer + Ekstrak

#### 4.4.7. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air dilakukan menggunakan metode destilasi azeotrop. Tabung penampung dan pendingin dibilas dengan air dan dikeringkan dalam lemari pengering. Ke dalam labu dimasukan sejumlah simplisia yang telah ditimbang secara seksama yang diperkirakan mengandung 2 mL sampai 4 mL air. 200 mL toluen yang telah dijenuhkan dengan air dimasukkan ke dalam labu, kemudian dihubungkan ke alat. Toluene dituangkan ke dalam tabung penerima (R), lalu labu dipanaskan selama 15 menit.

Setelah 15 menit tabung penerima pendingin dibiarkan hingga mencapai suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca kadar air dihitung dalam persen (Depkes RI, 2000:16). Kadar air dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{mL air} \times B_j \text{ air (g/mL)}}{\text{Berat bahan awal (g)}} \times 100\% \quad (10)$$

#### 4.5. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap simplisia, ekstrak, dan fraksi terpilih meliputi pemeriksaan golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, senyawa polifenolat, monoterpen dan seskuiterpen, serta triterpenoid dan steroid. Prosedur penapisan fitokimia pada ekstrak ataupun fraksi sama seperti yang dilakukan pada simplisia.

##### 4.5.1. Alkaloid

Simplisia atau ekstrak masing-masing ditambahkan amonia 25% dan kloroform lalu digerus kuat-kuat. Campuran disaring dan filtrat digunakan untuk

percobaan (larutan A). Larutan A diteteskan pada kertas saring dan disemprotkan pereaksi Dragendorff, reaksi positif menunjukkan warna merah atau jingga. Sisa larutan A dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan asam klorida 10% lalu lapisan air atau fraksi asamnya dipisahkan (larutan B). Campuran dibagi dalam 2 tabung reaksi, pada tabung pertama diuji dengan pereaksi Mayer, hasil positif bila endapan putih yang terbentuk bertahan selama 15 menit. Pada tabung kedua ditambahkan pereaksi Dragendorff, hasil menunjukkan positif alkaloid bila terbentuk endapan merah bata yang bertahan selama 15 menit (Farnsworth, 1966:253).

#### **4.5.2. Flavonoid**

Beberapa gram simplisia atau ekstrak ditambahkan air panas, dididihkan selama 5 menit, dan disaring. Filtrat ditambahkan serbuk magnesium, asam klorida 2 N dan amil alkohol, lalu dikocok kuat-kuat dan didiamkan sampai memisah. Terbentuknya warna kuning-merah pada lapisan amil alkohol di bagian teratas menunjukkan adanya flavonoid (Farnsworth, 1966:262-263).

#### **4.5.3. Saponin**

Beberapa gram simplisia atau ekstrak ditambahkan air panas, dididihkan selama 3-5 menit. Setelah dingin, larutan dimasukkan dalam tabung reaksi dikocok kuat secara vertikal selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 menit. Reaksi positif menunjukkan terbentuknya busa yang bertahan selama kurang lebih 10 menit dengan ketinggian 1-10 cm. Busa ditambah dengan asam klorida 2 N beberapa tetes, apabila busa hilang maka saponin negatif sedangkan jika busa tidak hilang maka saponin positif (Farnsworth, 1966:258).

#### 4.5.4. Tanin

Beberapa gram serbuk simplisia atau ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan air panas, dididihkan selama 15 menit dan didinginkan kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi tiga bagian. Bagian pertama ditambahkan dengan besi (III) klorida akan terbentuk warna biru, biru-hitam, hijau atau biru-hijau dan endapan (tanin positif). Bagian kedua ditambahkan dengan gelatin 1% terbentuk endapan maka tanin positif. Bagian ketiga ditambahkan dengan pereaksi Steasny lalu dipanaskan di atas penangas akan terbentuk endapan merah muda menunjukkan positif tanin katekat, kemudian bagian ketiga ini disaring dan filtratnya dijenuhkan dengan penambahan natrium asetat serta beberapa tetes besi (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan positif tanin galat (Farnsworth, 1966:264).

#### 4.5.5. Kuinon

Beberapa gram serbuk simplisia atau ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan air panas, dididihkan 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan larutan natrium hidroksida 5% apabila membentuk warna kuning hingga merah menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966:265-266).

#### 4.5.6. Senyawa polifenolat

Simplisia atau ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan air secukupnya, lalu dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Larutan pereaksi besi (III) klorida ditambahkan ke dalam filtrat. 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).

#### 4.5.7. Monoterpena dan seskuiterpena

Sejumlah serbuk simplisia atau ekstrak digerus dengan eter, kemudian dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan larutan vanillin 10% dalam asam sulfat pekat. Warna-warna yang timbul menandakan positif senyawa monoterpen dan seskuiterpen.

#### 4.5.8. Triterpenoid dan steroid

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

#### 4.6. Ekstraksi

Serbuk simplisia diekstraksi secara bertingkat dengan menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol 70%, serta dilakukan pergantian pelarut hingga diperoleh tiga ekstrak cair. Kemudian ekstrak cair dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 30-40 °C hingga diperoleh ekstrak pekat dan dilakukan perhitungan rendemen ekstrak. Ekstrak kental kemudian dipekatkan kembali menggunakan *water bath* pada suhu 40 °C hingga beratnya stabil dan diperoleh ekstrak kering. Ekstrak didinginkan dan disimpan dalam wadah tertutup rapat.



#### **4.7. Isolasi**

Proses isolasi dilakukan dengan metode KLT preparatif menggunakan fasa diam silika gel 60 F<sub>254</sub> dan fasa gerak sesuai berdasarkan pemantauan pola kromatogram KLT. Pita terpilih dipisahkan dari fasa diam dengan cara pengerokan, kemudian pita hasil kerokan dilarutkan dalam metanol dan diambil filtratnya hingga terpisah sempurna dari silika gel. Selanjutnya filtrat diuapkan untuk memperoleh isolat.

#### **4.8. Uji Kemurnian**

Isolat yang diperoleh diuji kemurniannya menggunakan metode KLT pengembangan tunggal dengan tiga komposisi eluen berbeda dan KLT dua dimensi.

KLT pengembangan tunggal dilakukan menggunakan tiga komposisi eluen berbeda yaitu, yang bersifat nonpolar, semipolar, dan polar. Isolat murni ditandai dengan dihasilkannya satu bercak.

Metode KLT dua dimensi dilakukan menggunakan dua komposisi eluen berbeda yaitu, yang bersifat kurang polar dan lebih polar. Pertama, dilakukan elusi dengan eluen yang kurang polar. Kedua, plat KLT diputar 90° dari arah pertama dan dielusi menggunakan eluen yang lebih polar. Isolat murni ditandai dengan dihasilkannya satu bercak.

## 4.9. Karakterisasi Isolat

### 4.9.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis isolat dilakukan menggunakan:

Fasa diam : plat KLT GF<sub>254</sub>

Fasa gerak : kloroform : etil asetat (4:1)

Deteksi : sinar UV 254 dan 365 nm, serta penampak bercak asam sulfat pekat 10% dalam metanol.

Campuran pengembang (eluen) dibuat dan dimasukkan ke dalam bejana kromatografi serta dijenuhkan, kemudian isolat dari daun bidara upas ditotolkan pada plat KLT yang sebelumnya telah ditandai dengan batas. Selanjutnya ditunggu hingga fasa gerak mencapai batas akhir pengembangan pada plat KLT yang sebelumnya telah ditandai. Plat KLT dikeluarkan dari bejana dan dikeringkan. Setelah kering, bercak yang dihasilkan dideteksi menggunakan sinar UV 254 dan 365 nm serta menggunakan beberapa penampak bercak seperti asam sulfat 10% dalam metanol, AlCl<sub>3</sub> 5% dalam metanol, FeCl<sub>3</sub> 1% dalam air dan larutan DPPH 0,2% dalam metanol.

### 4.9.2. Spektrofotometer *UV-Visible*

Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang maksimal isolat. Blanko pelarut yaitu metanol yang diukur absorbansinya. Sampel isolat dilarutkan ke dalam metanol, kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer *UV-visible* tampak untuk mendapatkan spektrum isolat.

#### 4.9.3. Spektrofotometer Transformasi Fourier Inframerah atau *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Beberapa sampel diolah dengan cara yang berbeda, tergantung jenis sampelnya (padat, cair, dan gas). Sampel yang digunakan merupakan isolat murni dalam bentuk larutan (cairan murni). Jika jumlah sampel sedikit sekali atau tidak ada pelarut yang cocok, maka setetes cairan murni diapit dan ditekan di antara dua lempeng natrium klorida. Ketebalan dapat diatur antara 0,1-0,3 mm (Supratman, 2010:74).

Untuk pengukuran spektrum inframerah dibutuhkan senyawa sekitar 1-20 mg. Jika diperlukan jumlah senyawa dapat dikurangi menjadi beberapa  $\mu\text{g}$  dengan menggunakan teknik mikro. Menurut *European Pharmacopoeia 1* senyawa untuk pengukuran disiapkan sebagai cairan sebagai film. Beberapa tetes cairan diletakkan di atas lempeng natrium klorida yang diasah dan ditutup dengan lempeng natrium klorida kedu. Dengan menekan akan diperoleh suatu film tipis di antara kedua lempeng yang kemudian diletakkan dalam cahaya ukur. Cairan juga dapat diukur dalam kuvet dengan ketebalan tertentu (Roth dan Blaschke, 1981:389-390).