

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1 Pengumpulan, Determinasi, dan Pengolahan

Tumbuhan yang digunakan yaitu salak diperoleh dari desa Cijambu Kabupaten Sumedang, Jawa Barat. Setiap bagian dari tumbuhan ini dideterminasi untuk memastikan tanaman yang digunakan adalah tanaman tersebut. Determinasi dilakukan di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, kemudian bagian yang digunakan yaitu biji dipisahkan dari kulit dan daging buahnya yang kemudian dilakukan pencucian, disortasi, dan rajang menjadi ukuran yang lebih kecil, dikeringkan menggunakan lemari pemanas, dan dirajang kembali untuk menghasilkan ukuran yang lebih kecil dari sebelumnya.

4.2 Uji Makroskopik dan Miskroskopik

Makroskopik merupakan pengujian yang dilakukan dengan mata telanjang atau dengan bantuan kaca pembesar terhadap berbagai organ tanaman yang digunakan untuk simplisia.

Mikroskopik, pada umumnya meliputi pemeriksaan irisan bahan atau serbuk dan pemeriksaan anatomi jaringan itu sendiri. pemeriksaan mikroskopik juga digunakan untuk menjamin kebenaran dari simplisia penyusun dari simplisia dengan mengamati bentuk fragmen spesifik penyusun pada simplisia.

4.3 Penetapan Parameter Standar

4.3.1 Parameter Non Spesifik

a. Penetapan kadar abu total

Simplisia digerus, ditimbang dua sampai tiga gram lalu dimasukkan ke dalam krus silika yang telah dipijar dan ditara beratnya. Lalu dipijar lagi secara perlahan hingga arang habis, didinginkan lalu ditimbang. Lakukan proses hingga bobotnya tetap (Depkes RI, 2000: 17). Perhitungan kadar abu total dapat dihitung sebagai berikut:

$$\text{Kadar Abu Total} = \frac{\text{berat abu}}{\text{berat simplisia awal}} \times 100\%$$

b. Penetapan kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu total, dilarutkan dalam H₂SO₄ encer 25 ml lalu dididihkan selama lima menit, didinginkan. Setelah didinginkan, campuran disaring dengan kertas saring bebas abu lalu dicuci dengan air panas, dipijar, ditimbang hasil akhirnya (Depkes RI, 2000: 17). Perhitungan kadar abu total dapat dihitung sebagai berikut:

$$\text{Kadar Abu Tidak Larut Asam} = \frac{\text{berat abu tidak larut asam}}{\text{berat simplisia awal}} \times 100\%$$

c. Penetapan kadar air

Dimasukan lebih kurang 200 ml toluen kedalam labu, lalu jenuhkan toluen dengan 2 ml air aquades. Lalu dimasukan bahan pada labu yang berisi toluen, kemudian dipanaskan, suling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian air tersuling, kemudian naikan kecepatan penyulingan hingga 4

tetes tiap detik. setelah semua air tersuling, dibiarkan tabung penerima pendingin hingga suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, baca volume air, hitung kadar air dalam persen (Departemen Kesehatan, 2000: 14).

$$\text{➤ } \% \text{ kadar air} = \frac{\text{volume air yang didapat}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

d. Penetapan susut pengeringan

Timbang bahan 1-2 gram lalu dimasukkan kedalam krus yang telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara, lalu timbang krus yang berisi bahan. Ratakan, lalu dipanaskan didalam tanur, keringkan pada suhu 105°C hingga berat tetap. Biarkan krus dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu kamar.

$$\% \text{ Kadar susut pengeringan} = \frac{\text{bobot simplisia awal} - \text{bobot simplisia akhir}}{\text{bobot simplisia awal}} \times 100\%$$

e. Penetapan bobot jenis

Perhitungan bobot jenis dilakukan dengan cara piknometer kosong ditimbang (W1), lalu ditambahkan aquadest ke dalam piknometer tersebut kemudian ditimbang lagi (W2). Kemudian aquadest diganti dengan ekstrak yang didapat sebelumnya, kemudian ditimbang lagi (W3) (Departemen Kesehatan, 2000: 14). Bobot jenis dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Bobot jenis} = \frac{W_3 - W_1}{W_2 - W_1}$$

4.3.2 Parameter Spesifik

a. Uji Organoleptik

Simplisia segar dianalisis sifat organoleptiknya yang meliputi warna, bau, dan rasa. Pengujian dilakukan oleh lima orang. Hasil yang didapat merupakan identitas dari simplisia tersebut (Depkes RI, 2000: 31).

b. Penetapan kadar sari larut air

Simplisia segar dikeringkan di udara, kemudian ditimbang lima gram. Setelah kering dimaserasi selama 24 jam dengan campuran air : kloroform 100 ml. Campuran diaduk berkali-kali pada enam jam pertama, kemudian didiamkan pada 18 jam berikutnya. Hasil maserasi disaring, diambil 20 ml filtratnya kemudian diuapkan pada cawan berdasar rata yang telah ditara pada suhu 105°C (Depkes RI, 2000: 31). Lalu dihitung kadar sari larut air dengan rumus :

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{berat sari larut air} \times 5 \times 100\%}{\text{Berat sampel}}$$

b. Penetapan kadar sari larut etanol

Simplisia segar dikeringkan di udara, kemudian ditimbang lima gram. Setelah kering dimaserasi selama 24 jam dengan etanol 100 ml. Campuran diaduk berkali-kali pada enam jam pertama, kemudian didiamkan pada 18 jam berikutnya. Hasil maserasi disaring, diambil 20 ml filtratnya kemudian di uapkan pada cawan berdasar rata yang telah ditara pada suhu 105°C (Depkes RI, 2000: 31-32). Lalu dihitung kadar sari larut air dengan rumus :

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{berat sari larut etanol} \times 5 \times 100\%}{\text{Berat sampel}}$$

4.4 Ekstraksi

Ekstraksi bahan dilakukan secara menggunakan cara panas dengan menggunakan tiga preaksi yang berbeda, mulai dari pelarut yang non polar (n-heksan), semi polar (etil asetat) sampai pelarut polar (etanol 70%) menggunakan alat refluks. Bahan ditimbang, kemudian bahan direndam dengan ketiga pelarut tadi. pelarut pertama yang bersifat non polar (n-heksan) dimasukan pada labu dan pada tabung yang berisi simplisia tadi, kemudian alat dipanaskan. penggantian pelarut dilakukan sebanyak 3 kali setiap 3-4 jam. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan. Ekstraksi dilakukan sampai simplisia tersari semua. Setelah itu ampas yang telah diperoleh dikeringkan dulu sampai pelarut n-heksana menguap, kemudian proses refluks di atas diulang dengan cara yang sama seperti di atas terhadap pelarut etil asetat dan etanol 70%. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian di uapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

4.5 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan metabolit sekunder apa saja yang terdapat pada simplisia dan suatu ekstrak. Hal ini dilakukan dengan cara sebagai berikut (Farnsworth, 1966: 243-269)

1. Identifikasi golongan alkaloid

Bahan dibasakan dengan ammonia 1%, lalu ditambahkan kloroform, lalu lapisan kloroform dipipet. Filtrat yang dihasilkan ditambahkan dengan larutan asam

klorida 1 N. Larutan dikocok, lalu dibiarkan hingga terjadi pemisahan. Selanjutnya, bagian asam dipipet dan dibagi menjadi tiga bagian. Bagian I ditetesi dengan preaksi dragendorff, bagian yang II ditetesi dengan preaksi meyer, dan bagian III digunakan sebagai blanko. Hasil positif akan menunjukkan endapan yang berwarna merah kecoklatan pada bagian I, sedangkan pada bagian II menunjukkan endapan putih.

2. Identifikasi golongan polifenol dan tanin

Siapkan dua buah tabung reaksi, masing masing tabung diisi dengan simplisia, kemudian dilarutkan menggunakan air dan didihkan beberapa menit. Selanjutnya, tabung pertama ditetesi pereaksi besi (III) klorida, hasil positif jika menunjukkan warna biru hingga hitam, sedangkan pada tabung dua ditetesi larutan gelatin 1%, hasil positif menunjukkan endapan putih.

3. Identifikasi golongan flavonoid

Tabung reaksi yang berisi sampel dilarutkan dalam air, kemudian ditambahkan logam magnesium dan asam klorida 2 N, lalu dipanaskan selama 5-10 menit di penangas air. Kedalam filtrat ditambahkan amil alkohol, dikocok. Hasil positif mengandung flavonoid menunjukkan warna kuning hingga merah pada amil alkohol.

4. Identifikasi golongan saponin

Tabung reaksi yang berisi sampel lalu ditambahkan air, kemudian dipanaskan. Setelah dingin dikocok kuat kuat hingga beberapa menit. Pembentukan buih/busa diamati. Pembentukan buih/busa persisten selama 1-5

menit dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes larutan asam klorida 0,1 N menunjukkan adanya golongan saponin

5. Identifikasi golongan monoterpen dan sesquiterpen

Simplisia segar digerus, dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan eter 10 ml, dikocok lalu disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam cawan penguap, ditambahkan vanillin 10% dalam H₂SO₄ pekat, positif terdapat senyawa monoterpen dan sesquiterpen jika terbentuk warna hijau (Mustarichie *et al.*, 2011: 20).

6. Identifikasi golongan steroid dan triterpenoid

Simplisia segar digerus, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu ditambahkan pereaksi Libermann-Burchard 10 ml, kemudian dikocok. Simplisia positif mengandung steroid jika terbentuk warna merah dan warna ungu untuk positif triterpenoid.

7. Pemeriksaan golongan quinon

Simplisia segar digerus, dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan NaOH 1 N 10 ml. Positif quinon jika terbentuk warna merah.

4.6 *Brine Shrimp Lethality test (BSLT)*

Pada skrining aktifitas sitotoksik menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality test* (BSLT) dengan hewan percobaan *Artemia salina* dilakukan prosedur sebagai berikut (Pisutthanandkk., 2004).

1. Pembuatan medium penetasan

Disiapkan 40 gram garam natrium klorida yang dilarutkan dalam 1 liter aquadest, kemudian disaring menggunakan kertas saring.

2. Penetasan telur

Telur dari *Brine shrimp* (*Artemia salina*) ditetaskan di dalam air laut buatan yang disiapkan dari air laut komersial (40 g/L ditambah dengan 6 mg/L ragi kering). Telur *Brine shrimp* disebarakan, setelah inkubasi 48 jam, larva diambil dengan menggunakan pipet, dan cangkang telur dibiarkan

3. Uji *Brine Shrimp Lethality test* (BSLT)

Pengujian dilakukan dengan memasukan 10 ekor *A. salina* ke dalam vial yang telah berisi larutan uji. Efek toksik ditentukan setelah larva *A. salina* terpapar selama 24 jam dengan larutan uji dengan menghitung persentasi mortalitasnya. Pengujian dilakukan triplo. Sebagai blanko digunakan campuran dimetil sulfoksida (DMSO) dan medium pemeliharaan tanpa penambahan bahan uji lalu dibuat pengenceran yang sama seperti variasi konsentrasi bahan uji. Larva dianggap mati jika tidak lagi ada pergerakan selama pengamatan dan tidak hidup kembali meski dipindahkan pada medium pemeliharaan.

4. Perhitungan nilai LC₅₀

Efek toksik dianalisis dari pengamatan dengan menghitung persentase mortalitas.

$$\text{Mortalitas (\%)} = \frac{\text{jumlah } a.\text{salina yang mati}}{\text{jumlah populasi awal}} \times 100 \%$$

Grafik dibuat dengan log konsentrasi sebagai sumbu x terhadap persentase mortalitas sebagai y sehingga didapat persamaan garis $y = ax + b$. Selanjutnya dihitung LC_{50} dengan memasukan angka 50 sebagai y. Nilai x menunjukkan LC_{50} dari bahan uji. Nilai LC_{50} menunjukkan 50% kematian pada hewan uji pada konsentrasi tertentu. Apabila pada larutan kontrol ada *A. salina* yang mati, maka persentase mortalitas ditentukan dengan rumus Abbot

$$\text{Mortalitas } A. \text{ salina } (\%) = \frac{T-K}{10} \times 100 \%$$

Keterangan :

T = jumlah larva *A. salina* uji yang mati

K = jumlah larva *A. salina* kontrol yang mati

10 = jumlah larva *A. salina* uji

4.7 Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak yang memiliki aktifitas sitotoksik selanjutnya dipantau dengan kromatografi lapis tipis. Mula-mula disiapkan bejana, lalu diisi dengan larutan pengembang dan didiamkan hingga wadah jenuh dengan uap larutan pengembang. Plat KLT yang telah ditandai batas bawah dan batas atasnya. Selanjutnya larutan ekstrak atau fraksi ditotolkan pada garis awal atau bawah, dibiarkan mengering. Lalu lempengan pralapis tersebut dimasukkan ke dalam bejana yang berisi fase gerak didalamnya, diletakkan secara tegak lurus dan didiamkan hingga larutan fase gerak membawa sampel ekstrak terbawa naik hingga batas atas yang telah ditandai. Lalu plat KLT diangkat dan dikeringkan pada udara terbuka, diamati secara visual dibawah sinar UV 254 dan 366nm, serta dengan penampak bercak universal (asam sulfat 10% dalam metanol), dan penampak bercak spesifik

menggunakan FeCl_3 , AlCl_3 , dan Lieberman Buchardt, kemudian bercak yang terlihat tandai. Nilai R_f yang diperoleh dihitung dengan rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa terlarut(sampel)}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

