

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1 Pengumpulan Bahan dan Determinasi

Daun kenikir dan daun sintrong yang akan digunakan berasal dari desa Tugu, Lembang, Jawa Barat. Daun kenikir dan daun sintrong tersebut merupakan tumbuhan yang diperoleh dari perkebunan pribadi warga setempat. Selanjutnya, kedua tumbuhan tersebut dideterminasi di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran.

4.2 Uji Makroskopik Tumbuhan

Dilakukan pengamatan terhadap beberapa parameter meliputi bentuk, tekstur, warna, serta ukuran panjang dan lebar daun tumbuhan kenikir dan sintrong. Pengamatan ini dilakukan untuk memastikan kebenaran jenis dari tumbuhan yang digunakan (Ditjen POM, 2000 : 31).

4.3 Uji Mikroskopik Tumbuhan

Dilakukan pengamatan terhadap beberapa parameter meliputi bentuk, tekstur, warna, serta ukuran panjang dan lebar daun tumbuhan kenikir dan

sintrong. Pengamatan ini dilakukan untuk memastikan kebenaran jenis dari tumbuhan yang digunakan (Ditjen POM, 2000 : 31).

4.4 Preparasi Simplisia

Daun kenikir dan daun sintrong tersebut disortasi basah, lalu dicuci hingga bersih lalu ditiriskan. Setelah itu, daun kenikir dan daun sintrong tersebut dirajang sehingga diperoleh ukuran yang lebih kecil. Kemudian masing-masing simplisia segar tersebut disimpan pada wadah tertutup rapat sebelum dilakukan pengolahan selanjutnya.

4.5 Penapisan Fitokimia

4.5.1 Alkaloid

Sebanyak 0,5 g sampel uji ditambahkan aquadest, lalu dipanaskan selama 2 menit di atas penangas. Kemudian campuran tersebut disaring dan ditambahkan asam klorida 10% v/v akan terbentuk 2 fase. Selanjutnya fase air diuji menggunakan beberapa pereaksi. Filtrat pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer dan akan terbentuk endapan berwarna putih atau kuning. Filtrat kedua ditambahkan pereaksi Dragendorff dan akan terbentuk warna jingga kemerahan (Harborne, 1987 : 245).

4.5.2 Saponin

Sebanyak 0,5 g sampel uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air panas dan didinginkan. Kemudian tabung reaksi dikocok kuat selama 10 detik. Adanya pembentukan buih setinggi 1 sampai 10 cm pada permukaan air serta tidak hilang selama 10 menit menunjukkan adanya kandungan saponin (Farnsworth, 1966 : 257).

4.5.3 Flavonoid

Sebanyak 10 g sampel uji digerus dan ditambahkan etanol. Didihkan selama 5 menit kemudian disaring. 5 mL filtrat diambil dan ditambahkan 1 g serbuk magnesium dan 1 mL asam sulfat. Campuran tersebut dikocok dan didiamkan hingga memisah. Terbentuknya warna merah stabil selama 3 menit menunjukkan adanya kandungan flavonoid (Farnsworth, 1966 : 263).

4.5.4 Tanin

Sebanyak 0,5 g sampel uji ditambahkan 10 mL aquadest lalu diekstraksi dengan pemanasan, kemudian disaring. 2 mL larutan diambil dan ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Terbentuknya warna biru kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Farnsworth, 1966 : 264).

4.5.5 Kuinon

Sejumlah sampel uji ditambahkan sedikit NaOH 0,1 N. Akan terbentuk warna kuning jika terkandung senyawa kuinon (Harborne, 1987 : 109).

4.5.6 Fenol

Sejumlah sampel uji ditambahkan 20 mL etanol 70% lalu diekstraksi. 1 mL larutan diambil dan ditambahkan 2 tetes FeCl_3 5%. Terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya kandungan senyawa fenol (Harborne, 1987 : 49).

4.5.7 Monoterpen/ seskuiterpen

Sejumlah sampel uji ditambahkan eter, lalu digerus dan disaring. Filtrat tersebut diuapkan dan ditambahkan vanillin dalam HCl pekat. Terbentuknya warna menunjukkan adanya kandungan senyawa monoterpen dan seskuiterpen (Harborne, 1987 : 135).

4.5.8 Triterpenoid/ steroid

Sebanyak 1 g sampel uji dimaserasi menggunakan 20 mL eter selama 2 jam lalu disaring. Filtrat yang dihasilkan kemudian diuapkan di atas penangas air menggunakan cawan penguap. Ekstrak kental kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Terbentuknya warna ungu

menunjukkan adanya kandungan triterpenoid sedangkan warna hijau kebiruan menunjukkan adanya kandungan steroid (Farnsworth, 1966 : 142, 147).

4.6 Penetapan Parameter Standar Simplisia

4.6.1 Uji organoleptik

Dilakukan pengamatan pada sampel uji terhadap beberapa parameter seperti bentuk, warna, bau dan rasa. Pengamatan dilakukan oleh 5 orang sukarelawan agar didapatkan hasil yang objektif (Ditjen POM, 2000 : 31).

4.6.2 Kadar sari larut air

Sebanyak 5 g serbuk sampel uji dimasukkan ke dalam labu bersumbat dan ditambahkan 100 mL air-kloroform P. Kemudian dilakukan maserasi selama 24 jam sambil diaduk sesekali. Kemudian disaring dan diambil 20 mL filtrat untuk diuapkan hingga kering menggunakan cawan dengan permukaan datar yang telah ditara. Selanjutnya cawan dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Sari larut air dihitung dalam bentuk persen kadar terhadap simplisia awal (Depkes RI, 1989 : 159).

$$\% \text{ Kadar sari larut air} = \frac{\text{Bobot sari larut air}}{\text{Bobot simplisia}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

4.6.3 Kadar sari larut etanol

Sebanyak 5 g serbuk sampel uji dimasukkan ke dalam labu bersumbat dan ditambahkan 100 mL etanol (95%). Kemudian dilakukan maserasi selama 24 jam sambil diaduk sesekali. Kemudian disaring dengan hati-hati dan cepat agar tidak terjadi penguapan etanol (95%). Kemudian diambil 20 mL filtrat untuk diuapkan hingga kering menggunakan cawan dengan permukaan datar yang telah ditara. Selanjutnya cawan dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Sari larut etanol dihitung dalam bentuk persen kadar terhadap simplisia awal (Depkes RI, 1989 : 159).

$$\% \text{ Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{Bobot sari larut etanol}}{\text{Bobot simplisia}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

4.6.4 Kadar abu total

Sebanyak 2 g serbuk sampel uji ditimbang dengan seksama lalu dimasukkan dan diratakan ke dalam krus silikat yang sudah dipijar dan ditara. Pijarkan krus perlahan-lahan pada suhu 600°C hingga arang yang ada habis, lalu didinginkan dan ditimbang kembali hingga bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap simplisia awal (Depkes RI, 1989 : 155).

$$\% \text{ Kadar abu} = \frac{\text{Bobot abu}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

4.6.5 Kadar abu tidak larut asam

Abu hasil penetapan kadar abu total ditambahkan 25 mL asam klorida 2 N dan dididihkan selama 5 menit. Bagian yang tidak larut disaring menggunakan kertas saring bebas abu lalu dibilas menggunakan air panas. Residu dipijarkan pada suhu 600°C hingga bobot tetap., lalu didinginkan dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut asam tersebut dihitung terhadap simplisia awal (Depkes RI, 1989 : 155).

$$\% \text{ Kadar abu} = \frac{\text{Bobot abu tidak larut asam}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

4.7 Ekstraksi

Daun kenikir dan daun sintrong yang sudah dirajang masing-masing diekstraksi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol 70% secara maserasi. Masing-masing simplisia dimasukkan ke dalam bejana tertutup dan ditambahkan n-heksana hingga terendam. Maserasi dilakukan selama 24 jam dengan sesekali diaduk. Prosedur ini dilakukan sebanyak 3 kali untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang optimal. Kemudian ekstrak n-heksana cair disaring dan ampasnya didiamkan hingga seluruh sisa pelarut menguap. Selanjutnya ampas kering masing-masing tumbuhan dimaserasi kembali menggunakan pelarut etil asetat selama 24 jam dengan sesekali diaduk. Prosedur ini dilakukan sebanyak 3 kali untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang optimal. Kemudian ekstrak etil asetat cair disaring dan ampasnya

didiamkan hingga seluruh sisa pelarut menguap. Selanjutnya ampas kering masing-masing tumbuhan dimaserasi kembali menggunakan pelarut etanol 70% selama 24 jam dengan sesekali diaduk. Prosedur ini dilakukan sebanyak 3 kali untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang optimal. Selanjutnya masing-masing ekstrak cair dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental dengan kekentalan yang cukup (Septiana dan Asnani, 2013).

4.8 Pemantauan Ekstrak dengan KLT

Secara umum, KLT dilakukan dengan cara menotolkan sedikit sampel pada salah satu ujung plat fasa diam berupa penjerap sebagai zona awal. Sampel kemudian dikeringkan dan bagian ujung yang telah ditotol oleh sampel dimasukkan ke dalam wadah berisi fase gerak yang mengandung dua hingga empat campuran pelarut. Jika fase diam dan fase gerak yang digunakan sesuai dengan sifat senyawa yang akan dipisahkan, maka komponen senyawa akan bergerak naik dengan kecepatan berbeda membentuk bercak-bercak pada plat fase diam. Ketika elusi sampai pada ujung, plat tersebut diangkat dan dikeringkan dari fase gerak untuk selanjutnya dilakukan deteksi bercak di bawah sinar UV pada panjang gelombang tertentu dengan atau tanpa pemberian penampak bercak.

Identifikasi senyawa pada KLT dilakukan dengan membandingkan nilai R_f yang dihasilkan dengan nilai R_f standar. Nilai R_f yang dihasilkan

tidak akan persis sama pada pengujian di laboratorium yang berbeda, sekalipun jika KLT dilakukan pada laboratorium yang sama, sehingga harus diperhatikan jarak migrasi dan posisi bercak standar untuk setiap senyawa (Dekker, 2003 : 1-2).

4.9 Penetapan Parameter Standar Ekstrak

4.9.1 Uji organoleptik

Dilakukan pengamatan pada sampel tumbuhan terhadap beberapa parameter seperti bentuk, warna, bau dan rasa. Pengamatan dilakukan oleh 5 orang sukarelawan agar didapatkan hasil yang objektif (Ditjen POM, 2000 : 31).

4.9.2 Bobot jenis

Piknometer dibersihkan, dikeringkan, lalu ditimbang bobot piknometer kosong, catat. Piknometer ditambahkan air hingga penuh lalu timbang bobot piknometer yang mengandung air, kemudian dicatat. Satu per satu ekstrak kental dimasukkan ke dalam piknometer dan kelebihan ekstrak dibersihkan lalu timbang bobot piknometer yang mengandung ekstrak kental, catat. Bobot jenis ekstrak dihitung dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air dalam piknometer bersuhu 25°C (Ditjen POM, 2000 : 13).

4.10 Pengujian aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Dibuat suspensi bakteri dengan mengambil inokulum bakteri sebanyak 3 ose bundar kemudian dimasukkan ke dalam larutan Nutrien Broth steril dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian sebanyak 100 µL suspensi bakteri dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan ditambahkan 20 mL Nutrien Agar cair bersuhu sekitar 40°C, putar perlahan sampai tercampur lalu biarkan memadat. Kemudian dilakukan pembuatan sumur menggunakan perforator dengan diameter 0,9 cm pada media yang sudah memadat. Pada setiap sumur kemudian dimasukkan masing-masing sampel uji berupa larutan ekstrak uji dengan konsentrasi 10.000 ppm, larutan pembanding oxytetrasiklin konsentrasi 15 ppm sebagai pembanding, serta larutan dimetilsulfoksida (DMSO) sebagai kontrol negatif. Masing-masing sampel uji, larutan pembanding dan larutan kontrol negatif dimasukkan sebanyak 100 µL. selain digunakan sebagai kontrol negatif, dimetilsulfoksida (DMSO) juga digunakan sebagai pelarut ekstrak. Setelah itu, cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-20 jam dan diukur zona hambat yang terbentuk pada masing-masing larutan ekstrak uji (Salni, dkk., 2011).

4.11 Penetapan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM)

Dibuat beberapa konsentrasi ekstrak aktif dari masing-masing ekstrak tumbuhan. Kemudian sebanyak 100 μ L suspensi bakteri dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan ditambahkan Nutrien Agar cair bersuhu 40°C sebanyak 20 mL, putar perlahan sampai tercampur dan biarkan memadat. Kemudian dilakukan pembuatan sumur menggunakan perforator dengan diameter 0,9 cm pada media yang sudah memadat. Pada setiap sumur kemudian dimasukkan sampel uji berupa rangkaian seri konsentrasi larutan ekstrak terpilih yang memiliki aktivitas antibakteri paling baik, larutan pembanding oxytetrasiklin konsentrasi 15 ppm, serta dimetilsulfoksida (DMSO) sebagai kontrol negatif. Ekstrak dilarutkan menggunakan dimetilsulfoksida (DMSO). Lalu cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-20 jam dan diukur zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi larutan ekstrak uji (Salni, dkk., 2011).