

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Determinasi tanaman

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah lada hitam (*Piper nigrum* L) dan biji buah pinang (*Areca catechu* L) yang diperoleh dari Balitro, Bogor. Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Biologi Universitas Padjajaran, Bandung.

4.2. Pembuatan Simplisia

Buah lada hitam dan biji buah pinang segar dicuci hingga terpisah dari pengotornya, kemudian dirajang. Dilakukan pengeringan secara diangin-anginkan dibawah sinar matahari, selama kurang lebih satu minggu. Kemudian dilakukan sortasi kering dan ditimbang beratnya.

4.3. Penapisan Fitokimia Pada Simplisia dan Ekstrak

Penapisan fitokimia dilakukan untuk melihat senyawa yang terkandung di dalam suatu simplisia atau ekstrak.

4.3.1. Senyawa polifenolat

Simplisia atau ekstrak buah lada hitam dan biji buah pinang masing-masing sebanyak 1 g ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan di atas penangas air, kemudian di saring

menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida. Apabila timbul warna hijau atau biru- hijau, merah ungu, biru hitam sampai hitam, maka menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1966: 264).

4.3.2. Flavonoid

Simplisia atau ekstrak buah lada hitam dan biji buah pinang masing-masing sebanyak 1 g ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan 100 mL air panas kemudian dididihkan selama 10 menit, campuran tersebut disaring, (Larutan A). Larutan A ini akan digunakan untuk pemeriksaan golongan senyawa flavonoid, saponin dan kuinon. Sebanyak 5 mL larutan A dicampur dengan serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida pekat dan 8 tetes amilalkohol, kocok dengan kuat. Biarkan sampai terjadi pemisahan dan timbulnya warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol menandakan positif flavonoid (Farnsworth, 1966: 262-263).

4.3.3. Tanin

Simplisia atau ekstrak buah lada hitam dan biji buah pinang masing-masing sebanyak 1 g ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan 100 mL air dan dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit kemudian didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama ditambahkan larutan gelatin 1% dan adanya endapan putih menandakan positif tanin dan bagian keduanya ditambahkan FeCl_3 1%, apabila terbentuk warna biru tua/hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin (Farnsworth, 1966: 264).

4.3.4. Kuinon

Simplisia atau ekstrak buah lada hitam dan biji buah pinang masing-masing ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan air secukupnya, dipanaskan di atas penangas air kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 20 mL larutan natrium hidroksida 1 N dan apabila timbul warna kuning sampai merah menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966: 265).

4.3.5. Monoterpen dan sesquiterpen

Simplisia atau ekstrak buah lada hitam dan biji buah pinang masing-masing digerus dengan eter kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan vanillin 10% dalam asam sulfat pekat dan apabila timbul warna-warna menandakan positif senyawa monoterpen dan sesquiterpen (Farnsworth, 1966: 132).

4.3.6. Triterpenoid dan steroid

Simplisia atau ekstrak buah lada hitam dan biji buah pinang masing-masing digerus dengan eter kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan pereaksi *Liebermann-Burchard* dan apabila timbul warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan apabila timbul warna hijau-biru menandakan positif steroid (Farnsworth, 1966: 132).

4.3.7. Saponin

Simplisia atau ekstrak buah lada hitam dan biji buah pinang masing-masing ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan air secukupnya, kemudian dipanaskan di penangas air selama 30 menit dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dibiarkan sampai dingin, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik dengan arah vertikal dan terjadinya busa setinggi kurang lebih 1 cm yang bertahan selama 10 menit menandakan positif saponin dan busa tersebut masih bertahan setelah penambahan beberapa tetes HCl (Farnsworth, 1966: 258-259).

4.3.8. Alkaloid

Simplisia atau ekstrak buah lada hitam dan biji buah pinang masing-masing ditempatkan dalam mortir dan ditambahkan amoniak 25% yang kemudian digerus dan ditambahkan 20 mL CHCl_3 , gerus dengan kuat. Selanjutnya disaring dan diambil filtratnya (larutan 1). Larutan 1 tersebut ditambahkan dengan HCl 10% v/v hingga terbentuk dua fasa, kemudian pisahkan fasa air (larutan 2). Larutan 1 diteteskan pada kertas saring, semprotkan pereaksi *Dragendorff*. Apabila terbentuk warna merah/jingga maka positif alkaloid. (Farnsworth, 1966: 245-253).

4.4. Penetapan Parameter Non Spesifik dan Spesifik Pada Simplisia

Penetapan parameter spesifik dan non-spesifik dilakukan untuk memastikan bahwa kadar air, kadar sari larut air dan etanol tidak diluar batas yang ditentukan.

4.4.1. Penetapan Kadar Air dengan Metode Azeotroph

Tabung penampung dan kondensor dibilas dengan air, kemudian dikeringkan didalam oven. Dimasukkan 200 mL toluen yang telah dijenuhkan dengan aquadest, masukkan masing- masing sejumlah buah lada hitam dan biji buah pinang 25 g ke dalam labu bundar. Lalu dididihkan perlahan-lahan selama kurang lebih 15 menit (tambahkan serpihan batu didih). Setelah mendidih, suling dengan kecepatan 2 tetes/ detik hingga sebagian besar air tersuling, naikan kecepatan penyulingan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, bilas bagian kondensor dengan toluen. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit, kemudian hentikan pemanasan. Dinginkan tabung penerima sampai suhu kamar, hilangkan tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima. Biarkan air dan toluen dalam tabung penerima memisah. Baca volume air dalam tabung penerima. Hitung kadar air dalam % dengan rumus:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{volume air(ml)} \times \text{Bjair (g/ml)}}{25 \text{ gram simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

(DepKes RI, 2000: 31)

4.4.2. Penetapan Kadar Sari Larut Air

Sebanyak masing-masing 5 g serbuk buah lada hitam dan biji buah pinang selama 24 jam dengan 100 mL air dan 10 tetes kloroform LP menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama enam jam pertama dan kemudian

dibiarkan selama 18 jam lalu disaring. Sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara, kemudian sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam air dinyatakan dalam persen (%), dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara. Kadar sari larut air dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{berat sari larut air (gram)}}{\text{berat bahan awal (gram)}} \times 100\% \quad (2)$$

(DepKes RI, 2000: 31)

4.4.3. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Sebanyak masing-masing 5 gram serbuk buah lada hitam dan biji buah pinang selama 24 jam dengan 100 mL etanol (96%) menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama enam jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam lalu disaring dengan cepat untuk menghindarkan penguapan etanol. Sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara, kemudian sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol dinyatakan dalam persen (%) dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara. Kadar sari larut etanol dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{berat sari larut etanol (gram)}}{\text{berat bahan awal (gram)}} \times 100\% \quad (3)$$

(DepKes RI, 2000: 31-32)

4.4.4. Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 2 gram masing-masing buah lada hitam dan biji buah pinang ditimbang lalu dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, serbuk diratakan. Bahan dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan, dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, maka ditambahkan air panas lalu disaring melalui kertas saring bebas abu. Sisa bahan dan kertas saring dipijarkan dengan krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan, dan dipijarkan pada suhu 450°C hingga bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{berat awal(gram)} - \text{berat akhir (gram)}}{\text{berat awal (gram)}} \times 100\% \quad (4)$$

(Depkes RI, 2000: 17)

4.5. Pembuatan Ekstrak Buah Lada Hitam dan Biji Buah Pinang

Pembuatan ekstrak buah lada hitam dan biji buah pinang dilakukan dengan dua jenis ekstraksi cara panas yaitu dekokta dan soxhlet.

4.5.1. Metode Dekokta

Sebanyak 2 kg serbuk buah lada hitam dan biji buah pinang masing-masing ditimbang dan dimasukkan ke dalam panci *stainless stell*. Dimasukkan aquadest sebanyak 6 L (Perbandingan serbuk dengan aquadest 1:12). Panci dimasukkan ke dalam penangas berisi air mendidih bersuhu 90°C, kemudian panaskan selama 30 menit. Lakukan penyaringan sehingga didapat ekstrak cair.

4.5.2. Metode Soxhlet

Sebanyak 2 kg serbuk buah lada hitam dan biji buah pinang masing-masing ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung berpori yang dibuat dari kertas saring. Tabung berpori yang telah berisi simplisia di tempatkan di bagian dalam pipa soxhlet. Bagian bawah alat soxhlet disambungkan dengan labu ekstraksi yang berisi pelarut etanol 70% sebanyak 15 L dan batu didih. Bagian atas soxhlet disambungkan dengan kondensor. Setiap sambungan alat soxhlet harus selalu dilumasi dengan vaselin album. Setelah alat soxhlet terpasang seluruhnya, buka aliran air yang masuk ke kondensor, lalu nyalakan pemanas. Lakukan proses ekstraksi dengan selalu mengatur suhu, hingga tetesan ekstrak tidak berwarna lagi, kemudian dinginkan. Siklus soxhlet yang baik pada umumnya 20-25 siklus.

4.6. Formulasi Tablet Mengandung Ekstrak Buah Lada Hitam dan Biji Buah pinang

Dibuat tablet dengan bobot 250 mg menggunakan jenis pengikat yaitu PVP dan Amylum manihot terhadap ekstrak dekok dan soxhlet yang diperoleh.

Tabel IV.1. Formulasi Tablet dengan bahan pengikat PVP

Bahan	Formula		
	I	II	III
Zat aktif lada (mg)	57	57	57
Zat aktif pinang (mg)	43	43	43
Fase dalam (92%)			
PVP (%)	1	3	5
Amprotab (%)	10	10	10
Laktosa	q.s	q.s	q.s
Fase luar (8%)			
Amprotab (%)	5	5	5
Talk (%)	2	2	2
Mg stearat (%)	1	1	1

Tabel IV.2. Formulasi Tablet dengan bahan pengikat Amylum Manihot

Bahan	Formula		
	IV	V	VI
Zat aktif lada (mg)	57	57	57
Zat aktif pinang (mg)	43	43	43
Fase dalam (92%)			
Amylum manihot (%)	5	7,5	10
Amprotab (%)	10	10	10
Laktosa	q.s	q.s	q.s
Fase luar (8%)			
Amprotab (%)	5	5	5
Talk (%)	2	2	2
Mg stearat (%)	1	1	1

4.7. Prosedur Pembuatan Tablet

4.7.1. Pembuatan Larutan Pengikat

PVP konsentrasi 1, 3, dan 5% ditimbang sejumlah yang diperlukan pada setiap formula kemudian dilarutkan dalam etanol yang merupakan hasil orientasi penambahan pengikat cara kering. Aduk hingga homogen.

Amylum manihot konsentrasi 5, 7,5, 10% ditimbang sejumlah yang dibutuhkan pada setiap formula. Kemudian dilarutkan dalam air panas aduk homogen sehingga amyllum manihot membentuk muchilago.

4.7.2. Pembuatan Granulasi dan Tablet

Ekstrak buah lada hitam dan biji buah pinang, amprotab dan laktosa dicampur sampai homogen, kemudian tambahkan larutan PVP/mucilago sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai terbentuk massa basah yang sesuai untuk dibuat granul (massa harus dapat dikepal namun dapat dipatahkan). Massa basah tersebut kemudian diayak dengan ayakan mesh 14. Granul basah dikeringkan dalam oven dengan suhu 40-60°C sampai kandungan lembab kurang dari 2%.

Granul yang telah kering diayak kembali dengan ayakan mesh 16, selanjutnya granul tersebut ditimbang dan dievaluasi.

Granul yang telah memenuhi syarat dapat dicampur dengan fasa luar (talk dan amprotab), aduk sekitar 10 menit hingga homogen kemudian tambahkan Mg stearat, aduk selama 2 menit. Massa siap cetak dievaluasi kemudian ditabletasi dengan menggunakan punch diameter 13 atau 20 mm dengan bobot yang telah ditentukan (dari hasil perolehan granul). Tablet dievaluasi menurut persyaratan yang berlaku.

4.8. Evaluasi Granul

4.8.1. Penentuan kecepatan alir

1. Metode corong

Sejumlah granul yang diperoleh dimasukkan ke dalam corong pisah dengan ukuran tertentu yang lubang bawahnya ditutup, kemudian diratakan. Pada bagian bawah corong diberi alas. Corong digetarkan sampai seluruh granul mengalir keluar dari lubang corong. Baca waktu yang diperlukan untuk mengalirkan seluruh granul keluar dari corong. Kecepatan alir dihitung dengan membagi bobot granul (gram) dengan waktu yang dibutuhkan granul untuk melewati corong(gram/detik).

Penafsiran hasil:

Aliran granul yang baik jika waktu yang diperlukan untuk mengalirkan 100 g granul \leq 10 detik.

2. Metode sudut baring (istirahat)

Granul dimasukkan ke dalam corong. Biarkan granul mengalir bebas dari lubang corong/ silinder dan ditampung pada suatu bidang datar hingga timbunan granul tersebut membentuk kerucut. Dari timbunan tersebut diukur sudut istirahat (sudut antara lereng granul dengan bidang datar). Semakin kecil sudut istirahat yang terbentuk maka semakin baik alirannya.

$$\tan \alpha = \frac{D}{H} \quad (5)$$

Nilai α

Jika $\alpha = 25-30^\circ$ granul sangat mudah mengalir

Jika $\alpha = 30-38^\circ$ granul mudah mengalir dan

Jika $\alpha > 38^\circ$ granul kurang mengalir (Lachman, 2008:685).

4.8.2. Penentuan kelembaban

Granul ditimbang sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam alat *Moisture Analyzer*, kemudian ditara. Amati sampai skala pada alat tidak berubah (stabil). Baca kadar air yang tertera pada skala (%). Kadar air granul yang baik $< 3\%$ (Depkes RI, 1995: 4-6).

4.8.3. Penentuan bobot jenis

1. Bj nyata

Timbang 100 gram granul dan masukkan dalam gelas ukur. Catat volumenya.

$$P = \frac{W}{V} \quad (6)$$

Dimana:

P = Bj nyata

W = Bobot granul

V = Volume granul tanpa pemampatan

2. Bj mampat

Timbang 100 gram granul dan masukkan ke dalam gelas ukur lalu catat volumenya (V_0). Gelas ukur diketuk sebanyak 500 kali. Catat volumenya (V_{10} dan V_{500}).

$$P = \frac{W}{V_{500}} \quad (7)$$

Dimana:

P = Bj nyata
W = Bobot granul
V = Volume granul tanpa pemampatan

3. Bj sejati

Bj sejati merupakan masa granul dibagi volume granul yang tidak termasuk pori granul, dengan menggunakan alat piknometer.

$$\text{Bj Sejati} = \frac{(b-a) \times \text{Bj cairan pendispersi}}{(b+d) - (a+c)} \quad (8)$$

Keterangan:

a = bobot piknometer kosong
b = bobot piknometer + 1g granul
c = bobot piknometer + 1g granul + cairan pendispersi
d = bobot piknometer + cairan pendispersi

4.8.4. Kadar pemampatan

Sama dengan prosedur Bj mampat.

$$K_p = \frac{V_0 - V_{500}}{V_0} \times 100\% \quad (9)$$

Dimana:

K_p = Kadar pemampatan
V₀ = Volume granul sebelum pemampatan
V₅₀₀ = Volume granul pada 500 kali ketukan

Penafsiran hasil:

Granul memenuhi syarat jika $K_p \leq 20\%$

4.8.5. Perbandingan haussner

Sama dengan prosedur Bj mampat.

$$\text{Angka Haussner} = \frac{\text{Bj mampat}}{\text{Bj nyata}} \quad (10)$$

Penafsiran hasil:

Granul memenuhi persyaratan jika angka *Haussner* ≈ 1

4.8.6. Persen kompresibilitas

Sama dengan prosedur Bj mampat.

$$\% K = \frac{\text{Bj mampat} - \text{Bj nyata}}{\text{Bj mampat}} \times 100\% \quad (11)$$

Penafsiran hasil:

5-15% = aliran sangat baik

16-25% = aliran baik

$\geq 26\%$ = aliran buruk (Depkes RI, 1995:4-6).

4.8.7. Granulometri

Timbang sejumlah gram granul, letakkan granul pada pengayak paling atas. Getarkan mesin 5 – 30 menit, tergantung dari ketahanan granul pada getaran. Timbang granul yang tertahan pada tiap- tiap pengayak. Hitung presentase granul pada tiap- tiap pengayak.

4.9. Evaluasi Tablet

4.9.1. Penampilan tablet/ organoleptik

Dilakukan dengan secara visual terhadap sediaan yang meliputi bentuk, warna, bau dan rasa.

4.9.2. Keseragaman ukuran

Diambil secara acak 20 tablet, lalu diukur diameter dan tebalnya menggunakan jangka sorong. Diameter tablet yang baik tidak lebih dari 3 kali dan tidak kurang dari $1\frac{1}{3}$ tebal tablet (Dirjen POM, 1979:6-7).

4.9.3. Keseragaman bobot

Keseragaman sediaan dapat ditetapkan dengan besar kecilnya penyimpangan bobot tablet yang dihasilkan dibandingkan dengan bobot rata-rata dari semua tablet sesuai dengan persyaratan yang ditentukan. Keseragaman bobot yang ditetapkan sebagai berikut:

- 1) Diambil 20 tablet secara acak, lalu masing-masing tablet ditimbang.
- 2) Dihitung bobot rata-rata dan penyimpangan terhadap bobot rata-rata.
- 3) Tidak boleh ada 2 tablet yang menyimpang dari bobot rata-rata kolom A dan tidak boleh ada satupun tablet yang menyimpang dari bobot rata-rata kolom B.

Tabel 4.3. Penyimpangan bobot rata-rata (Depkes RI, 1979: 7)

Bobot rata-rata	Penyimpangan bobot rata-rata (%)	
	A	B
< 25 mg	15	30
26 mg - 150 mg	10	20
151 – 300 mg	7,5	15
>300 mg	5	10

4.9.4. Kekerasan tablet

Dilakukan terhadap 20 tablet yang diambil secara acak. Kekerasan diukur berdasarkan luas permukaan tablet dengan menggunakan beban yang dinyatakan dalam kg/ cm², alat tersebut disebut dengan *Hardness Tester*. Ditentukan

kekerasan rata-rata dan standar deviasinya. Tablet kecil memiliki kekerasan yang baik 4 kg/cm² (Ansel, 1989:255).

4.9.5. Friabilitas dan friksibilitas

Dilakukan terhadap 20 tablet (jika bobot tablet > 250 mg) atau 40 tablet (jika bobot tablet < 250 mg) yang diambil secara acak. Tablet tersebut dibersihkan dari debu satu persatu dengan sikat halus, lalu ditimbang (a). Masukkan tablet ke dalam alat (Friabilator dan friksibilator, lalu putar sebanyak 100 putaran. Lalu tablet dibersihkan lagi dan ditimbang (b).

$$f = \frac{a-b}{a} \times 100\% \quad (12)$$

Keterangan :

F = friabilitas atau Friksibilitas

a = bobot tablet sebelum diuji

b = bobot tablet setelah diuji

Penafsiran hasil :

Tablet yang baik memiliki friabilitas < 1% (Lachman, 2008:654).

4.9.6. Uji Waktu Hancur

Bejana diisi dengan aquadest dan dipanaskan sampai suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$, Selanjutnya enam tablet dimasukkan satu persatu ke dalam masing-masing tabung dan tutup masing-masing tabung, kemudian alat *Disintegration Tester* dinyalakan dan atur naik turun keranjang 30 kali tiap menit. Waktu hancur yang baik kurang dari 15 menit untuk tablet tidak bersalut (Dirjen POM, 1979: 6-7).