

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Pengambilan Sampel Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian tanaman delima yaitu kulit buah, daun dan biji delima yang diperoleh dari Instalasi Tanaman Obat dan Industri Manoko, Kecamatan Lembang, Kabupaten Bandung Barat.

4.2. Pembuatan Simplisia dan Serbuk Simplisia

Daun, kulit buah dan biji delima dibersihkan di bawah air mengalir secara terpisah, disortasi basah, ditiriskan kemudian daun, kulit buah dan biji dikeringkan dengan cara di oven pada suhu 30⁰C-90⁰C. Setelah kering, kemudian dilakukan sortasi kering dan dibuat serbuk, kemudian simplisia kering daun, kulit buah dan biji diproses menggunakan metode infusa dan dekokta.

4.3. Pemeriksaan Makroskopik dan Mikroskopik

Pemeriksaan makroskopik meliputi bentuk warna, tekstur, bentuk serta ukuran bagian tanaman yang digunakan yaitu kulit buah, daun dan biji delima. Pemeriksaan mikroskopik meliputi pemeriksaan pada simplisia yaitu daun, kulit buah dan biji delima untuk melihat fragmen-fragmen serta karakteristik penanda lain.

4.4. Penetapan Parameter Standar Simplisia dan Ekstrak

Pengujian parameter standar dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak, terdiri dari parameter standar spesifik dan parameter standar non spesifik menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Parameter standar non spesifik dan parameter standar spesifik bertujuan untuk menetapkan kualitas ekstrak dan simplisia. Parameter standar non spesifik meliputi susut pengeringan, kadar air, kadar abu total, kadar abu tak larut asam dan bobot jenis dan parameter standar spesifik meliputi uji organoleptik, kadar sari larut air dan larut etanol (Depkes RI, 2000:2).

4.4.1. Penetapan susut pengeringan

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 1 atau 2 gram, dimasukkan ke dalam cawan penguap yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Pengeringan dilakukan pada suhu 105°C selama 10 menit lalu dimasukkan dalam eksikator hingga suhu dingin dan ditimbang. Pengeringan dilakukan hingga didapat bobot simplisia atau ekstrak antara 2 penimbangan, perbedaannya tidak kurang dari 0,5 mg. Susut pengeringan dihitung dengan rumus (Depkes RI, 2000:13).

$$\text{Susut Pengeringan} = \frac{\text{Berat zat yang dipanaskan}(gr)}{\text{Berat bahan awal}(gr)} \times 100\% \quad (1)$$

4.4.2. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air pada simplisia dilakukan dengan metode destilasi azeotroph. Penetapan kadar air bertujuan untuk menentukan jumlah air dan

memberikan batasan maksimal atau rentang besarnya kandungan air di dalam simplisia (Depkes RI, 2000:14). Sebanyak 25 gram simplisia dimasukan ke dalam labu destilasi, kemudian ke dalamnya di tambahkan toluen jenuh 200 ml, lalu destilasi dihubungkan. Setelah itu dipanaskan selama 15 menit. Volume air diamati setelah toluen dan air memisah sempurna. Kadar dihitung terhadap bobot serbuk kering. Kadar air dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{ml air} \times \text{bj air (gr/ml)}}{\text{Berat bahan awal (gr)}} \times 100\% \quad (2)$$

4.4.3. Penetapan kadar abu total

Dua sampai tiga gram serbuk simplisia ditimbang, dimasukkan ke dalam krus yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan lalu ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat hilang, maka ditambahkan air panas kemudian disaring dengan kertas saring bebas abu. Sisa dan kertas saring dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan, dipijarkan hingga bobotnya tetap kemudian ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut: (Depkes RI, 2000:17).

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{Berat abu (gr)}}{\text{Berat bahan awal (gr)}} \times 100\% \quad (3)$$

4.4.4. Penetapan kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 mL asam sulfat encer selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara

dihitung. Kadar abu tidak larut asam dihitung dengan rumus: (Depkes RI, 2000:17).

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{Berat abu tidak larut asam (gr)}}{\text{Berat bahan awal (gr)}} \times 100\% \quad (4)$$

4.4.5. Penetapan bobot jenis

Digunakan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C. Suhu ekstrak cair diatur hingga lebih kurang 20°C, kemudian dimasukkan ke dalam piknometer. Diatur suhu piknometer yang telah diisi hingga 25°C, buang kelebihan ekstrak cair dan ditimbang. Bobot piknometer kosong dikurangkan dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air, dalam piknometer pada suhu 25°C. Bobot jenis dihitung dengan rumus: (Depkes RI, 2000:13).

$$\text{Bobot jenis} = \frac{w_3 - w_1}{w_2 - w_1} \quad (5)$$

Keterangan:

W1 = bobot piknometer kosong

W2 = bobot piknometer + air suling

W3 = bobot piknometer + ekstrak

4.4.6. Penetapan kadar sari larut air

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia atau ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air-kloroform (2,5 mL kloroform dalam air sampai satu liter), menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Disaring, 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, sisanya dipanaskan

pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam air dihitung terhadap ekstrak awal. Kadar sari larut air dihitung dengan rumus: (Depkes RI, 2000:31).

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{Berat sari larut air (gr)}}{\text{Berat bahan awal (gr)}} \times 100\% \quad (6)$$

4.4.7. Penetapan kadar sari larut etanol

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia atau ekstrak, dimaserasi 24 jam dengan 100 mL etanol (95%) menggunakan labu bersumbat sambil sekali-kali dikocok selama 6 jam pertama, dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring dengan cepat untuk menghindari penguapan etanol (95%) dan sebanyak 20ml filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol, dihitung terhadap ekstrak awal. Kadar air larut etanol dihitung dengan rumus: (Depkes RI, 2000:31).

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{Berat sari larut etanol (gr)}}{\text{Berat bahan awal (gr)}} \times 100\% \quad (7)$$

4.4.8. Organoleptik

Ekstrak dideskripsikan dari sifat organoleptik berupa bentuk, warna, bau, dan rasa. Uji organoleptik dapat dilakukan oleh lima orang responden yang berbeda. Hasil yang diperoleh merupakan identitas ekstrak yang dihasilkan. (Depkes RI, 2000:31).

4.5. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa alkaloid, senyawa polifenolat, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, monoterpenoid

dan seskuiterpenoid, dan steroid/triterpenoid yang terkandung dalam simplisia maupun ekstrak (Farnsworth, 1966).

4.5.1. Alkaloid

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia atau ekstrak masing-masing ditambahkan dengan amonia 25%, ditambah 20 mL kloroform dan digerus 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 dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 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 (Farnsworth, 1966:253).

4.5.2. Senyawa polifenolat

Simplisia atau ekstrak ditempatkan dalam tabung reaksi, ditambahkan air secukupnya, lalu dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Larutan pereaksi besi (III) klorida ditambahkan ke dalam filtrat dan timbulnya warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru hitam hingga hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1966:225).

4.5.3. Flavonoid

Sebanyak satu gram serbuk atau ekstrak masing-masing ditambahkan dengan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan serbuk magnesium, asam klorida 2 N dan amil alkohol, dikocok dan kemudian dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavanoid (Farnsworth, 1966:263).

4.5.4. Saponin

Sebanyak 1 gram serbuk atau ekstrak masing-masing ditambahkan dengan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat dalam tabung reaksi dikocok vertikal selama 10 detik, kemudian dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa selama kurang lebih 10 menit dengan ketinggian 1-10 cm maka saponin positif. Busa ditambah dengan HCL 2 N beberapa tetes, apabila busa hilang maka saponin negatif sedangkan jika busa tidak hilang maka saponin positif (Farnsworth, 1966:256).

4.5.5. Tanin

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi empat. Pertama, filtrat ditambahkan dengan FeCl_3 1% akan terbentuk warna biru tua maka tanin positif. Kedua, filtrat ditambahkan dengan gelatin 1% terbentuk endapan putih maka tanin positif. Ketiga, filtrat ditambahkan pereaksi steasny sebanyak 15 mL kemudian dipanaskan terbentuk endapan merah bata menunjukkan positif golongan tanin katekat. Keempat, filtrat

ditambahkan Natrium asetat dan FeCl_3 1% terbentuk warna biru tua menunjukkan golongan tanin galat (Farnsworth, 1966:264).

4.5.6. Kuinon

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan larutan NaOH 5% apabila membentuk warna jingga menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966:265).

4.5.7. Monoterpenoid dan seskuiterpenoid

Sejumlah serbuk simplisia atau ekstrak digerus dengan eter, kemudian dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, 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 ungu yang timbul menandakan positif triterpenoid, sedangkan bila warna hijau biru yang timbul menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 259).

4.6 Cara ekstraksi

4.6.1 Infusa

Infusa adalah ekstraksi dengan pelarut air pada suhu penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, suhu terukur 96°–98°C selama waktu tertentu (15 – 20 menit).

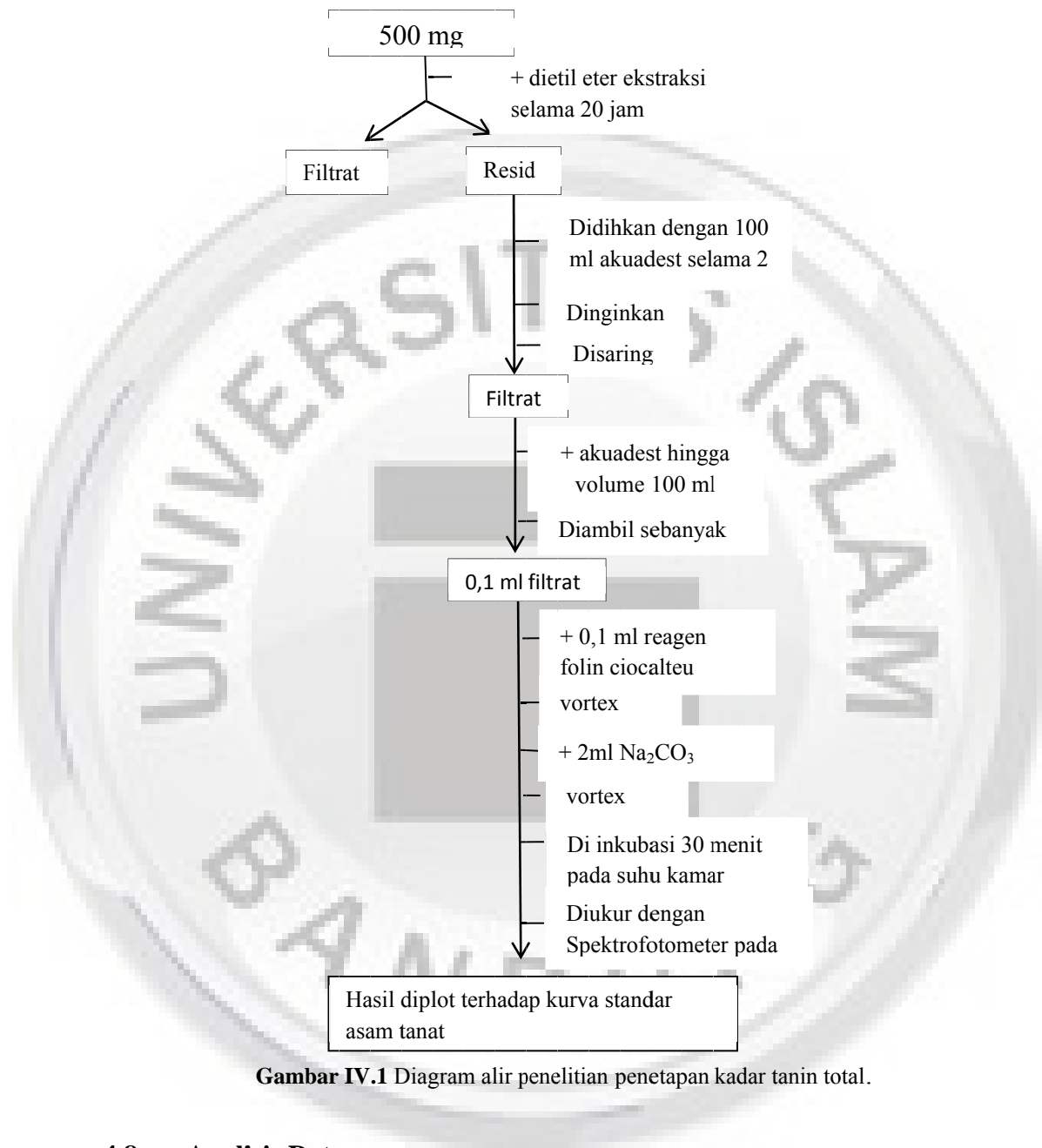
4.6.2 Dekokta

Dekokta adalah infus pada waktu yang lebih lama (≥ 30 menit) dan suhu sampai titik didih air yaitu suhu 100°C

4.7. Penetapan Kadar Tanin Total

Penetapan Kadar Tanin Total dilakukan dengan metode Chanwitheesuk *et al* (2004) yang sedikit dimodifikasi. Sampel sebanyak 500 mg diekstraksi dengan 10 ml dietil eter selama 20 jam, kemudian disaring dan residu yang diperoleh dididihkan dengan 100ml akuades selama 2 jam, kemudian didinginkan dan disaring. Ekstrak yang diperoleh ditambah dengan akuades hingga volume ekstrak 100 ml. Sebanyak 0,1 ml ekstrak ditambahkan dengan 0,1 ml reagen Folin Ciocalteu dan divortex, ditambahkan dengan 2 ml Na₂CO₃ dan divortex lagi.

Kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar, dan dilakukan pengukuran kadar menggunakan spektrofotometer uv-visible pada panjang gelombang 760 nm, Hasil yang diperoleh diplotkan terhadap kurva standar asam tanat yang dipersiapkan dengan cara yang sama. Kandungan total tanin dinyatakan dalam mg asam tanat. Diagram alir kerja penelitian dapat dilihat pada **Gambar IV.1** di bawah ini :



Gambar IV.1 Diagram alir penelitian penetapan kadar tanin total.

4.8. Analisis Data

Data kuantitatif berupa nilai diolah secara statistik menggunakan analisis variansi satu arah (*one way ANOVA*). (Pramesti, 2011).

Berdasarkan hipotesis (H) :

H_0 : Tidak ada perbedaan kadar tanin yang bermakna antara ekstrak daun, kulit buah dan biji.

H_1 : Terdapat perbedaan kadar tanin yang bermakna antara ekstrak daun, kulit buah dan biji.

Maka dipilih kriteria : Tolak H_0 jika $P\text{-value} < \alpha$.

