

## BAB IV

### PROSEDUR KERJA

#### 4.1. Penyiapan Bahan

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia daun dan buah karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (W. Aitt) Hassk.) yang diperoleh dari Belitung. Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati di Institut Teknologi Bandung (ITB). Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran jenis tumbuhan yang digunakan dalam penelitian. Daun dan buah karamunting yang telah dikumpulkan dicuci dengan air bersih untuk menghilangkan tanah dan pengotor lain yang melekat, kemudian ditiriskan agar terbebas dari sisa-sisa air pada saat pencucian. Selanjutnya dilakukan sortasi terhadap bagian yang digunakan, dari benda asing dan kerusakan. Pengeringan daun dan buah dilakukan dengan cara diletakkan 1 m di bawah atap yang terbuat dari seng menggunakan energi matahari tidak langsung (suhu udara 32°C), selama 7 hari. Simplisia daun yang sudah kering dibuat serbuk dengan cara diblender, sedangkan buah dalam bentuk rajangan dengan cara ditumbuk menggunakan mortir dan *stemper* hingga terbelah menjadi 3 bagian. Simplisia yang diperoleh disimpan di tempat kering dan tertutup rapat.

#### **4.2. Pemeriksaan Makroskopik**

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap bahan segar. Pemeriksaan meliputi bentuk, warna, bau dan rasa. Hasil yang diperoleh merupakan identitas awal simplisia yang dihasilkan (Depkes RI, 2000:31).

#### **4.3. Pemeriksaan Mikroskopik**

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan untuk melihat struktur dan fragmen-fragmen khas yang terdapat di bawah mikroskop serta karakteristik penanda lain. Pemeriksaan struktur daun dan buah yaitu membuat sayatan pada penampang melintang daun dan buah pada kaca objek kemudian diamati. Pengamatan dilakukan dengan cara diletakkan air (1 tetes) pada kaca objek kemudian ditambahkan irisan tipis karamunting, lalu ditutup dengan kaca penutup dan diamati di bawah mikroskopik (WHO, 2011:11-13).

#### **4.4. Penapisan Fitokimia**

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya golongan senyawa yang terkandung pada tanaman seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, polifenolat, kuinon, monoterpen dan seskuiterpen serta steroid dan triterpenoid.

##### **4.4.1. Alkaloid**

Sebanyak 2 gram bahan segar dan simplisia dari daun dan buah karamunting ditambahkan dengan 5 mL amoniak 25% kemudian digerus dalam mortar, ditambahkan 20 mL kloroform dan digerus kembali dengan kuat.

Campuran disaring dengan kertas saring dan filtrat diambil untuk digunakan pada percobaan selanjutnya (larutan A). Larutan A diteteskan pada kertas saring dan disemprot atau ditetesi dengan pereaksi Dragendorff. Warna merah jingga yang ditimbulkan pada kertas saring menunjukkan positif golongan senyawa alkaloid. Sisa larutan A diekstraksi dengan asam klorida 10% dan terbentuk 2 fase kemudian lapisan air dan fraksi asamnya dipisahkan (larutan B). Masing-masing 5 mL larutan B dalam tabung reaksi diuji dengan pereaksi Dragendorff, reaksi dinyatakan positif jika terbentuk endapan merah bata, dengan pereaksi Mayer terbentuk endapan putih yang bertahan selama 15 menit, maka positif alkaloid dan dengan pereaksi Libearment-Buchard timbul endapan coklat menandakan positif alkaloid (Farnsworth, 1966:245).

#### **4.4.2. Flavonoid**

— Terhadap 1 gram bahan segar dan simplisia dari daun dan buah karamunting ditempatkan dalam gelas kimia, kemudian ditambahkan 100 mL air panas dan dididihkan selama 15 menit. Campuran disaring dengan kertas saring, filtrat (larutan C) digunakan untuk pemeriksaan tanin dan saponin. 5 mL larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium secukupnya dan 1 mL asam klorida pekat. Setelah itu ditambahkan 5 mL amil alkohol, dikocok dengan kuat dan diamkan sampai memisah. Reaksi warna dalam lapisan amil alkohol menunjukkan positif golongan senyawa flavonoid (Farnsworth, 1966:262).

#### 4.4.3. Tanin

pertama ditambahkan larutan besi (III) klorida 1% akan terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan positif senyawa golongan tanin. Kedalam filtrat kedua ditambahkan larutan gelatin 1% akan terbentuk endapan putih yang menunjukkan positif senyawa golongan tanin. Ke dalam filtrat ketiga ditambahkan 15 mL pereaksi Steasny, lalu dipanaskan diatas penangas. Terbentuknya endapan merah muda menunjukkan positif tanin katekat. Hasil dari bagian ketiga disaring dan filtratnya dijenuhkan dengan penambahan natrium asetat, kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan besi (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan positif tanin galat (Farnsworth, 1966:264).

#### 4.4.4. Saponin

Bahan segar dan simplisia dari daun dan buah karamunting sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dikocok secara vertikal selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa 1 cm yang stabil selama tidak kurang 10 menit didalam tabung reaksi menunjukkan positif golongan senyawa saponin dan busa tersebut masih bertahan setelah ditambahkan beberapa tetes asam klorida 1% (encer) (Farnsworth, 1966:257 dan Depkes RI, 2000:36).

#### 4.4.5. Polifenolat

Bahan segar dan simplisia dari daun dan buah karamunting dalam tabung reaksi yang berbeda, 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 hingga hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1966:225).

#### **4.4.6. Kuinon**

Sejumlah simplisia dan bahan segar dari daun dan buah karamunting 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).

#### **4.4.7. Monoterpen dan seskuiterpen**

Sejumlah simplisia dan bahan segar dari daun dan buah karamunting 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 (Depkes RI, 1977:132).

#### **4.4.8. Steroid dan triterpenoid**

Simplisia dan bahan segar dari daun dan buah karamunting digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap kemudian dibiarkan menguap sampai kering. Ditambahkan larutan pereaksi Liebermann-Burchard. Terjadinya warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan warna hijau-biru menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1966:257).

#### 4.5. Parameter Standar Spesifik

Pengujian parameter standar spesifik yang dilakukan yaitu terdiri dari pengujian parameter identitas bahan segar, pengamatan organoleptik, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol dan penetapan bobot jenis pada ekstrak.

##### 4.5.1. Parameter Identitas

Parameter identitas dilakukan pada sampel segar yaitu daun dan buah karamunting dilakukan pengamatan dengan cara mengukur tinggi, luas dan lebar daun serta panjang dan diameter pada buah (Depkes RI, 2000:30).

##### 4.5.2. Organoleptik

Serbuk simplisia dan ekstrak dianalisis dari sifat organoleptisnya meliputi bentuk, warna, bau dan rasa (Depkes RI, 2000:31).

##### 4.5.3. Penetapan kadar sari larut air

Sebanyak 5 gram simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air-kloroform P menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring dan diuapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, kemudian sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap selama 6 jam, dinginkan dalam desikator selama 30 menit dan timbang dengan cepat. Kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung terhadap ekstrak awal berdasarkan rumus (1) (Depkes RI, 2000:31).

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{Berat sari larut air(g)}}{\text{Berat bahan awal(g)}} \times 100\% \times \frac{100}{20} \quad (1)$$

#### 4.5.4. Penetapan kadar sari larut etanol

Sebanyak 5 gram simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol (95%) menggunakan labu bersumbat sambil dikocok pada 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam lalu disaring dengan cepat untuk menghindari penguapan etanol. Sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam krus yang telah ditara, kemudian sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap selama 6 jam, didinginkan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang dengan cepat. Kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol (95%), dihitung terhadap ekstrak awal berdasarkan rumus (2) (Depkes RI, 2000:31).

$$\text{Kadar sari etanol} = \frac{\text{Berat sari larut etanol(g)}}{\text{Berat bahan awal(g)}} \times 100\% \times \frac{100}{20} \quad (2)$$

#### 4.6. Parameter Standar non Spesifik

Pengujian parameter standar non spesifik terdiri dari pengujian penetapan susut pengeringan, penetapan kadar air dan penetapan kadar abu.

##### 4.6.1. Penetapan susut pengeringan

Ditimbang sebanyak 2 gram simplisia dalam cawan penguap yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 100-105°C selama 30 menit dan telah ditara. Kemudian dimasukkan ke dalam ruang pengering, tutup dibuka, dikeringkan beserta tutupnya pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Sebelum pengeringan, krus dibiarkan dalam keadaan tertutup menjadi dingin dalam desikator hingga suhu kamar. Dihitung berat zat yang hilang dalam mg per simplisia berdasarkan rumus (3) (Depkes RI, 2000:35).

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{Berat zat setelah dipanaskan (g)}}{\text{Berat zat awal(g)}} \times 100\% \quad (3)$$

#### 4.6.2. Penetapan kadar air

Sejumlah 200 mL toluen dan 2 mL air dimasukkan ke dalam labu destilasi. Labu dipanaskan hingga larutan mendidih selama 2 jam. Kemudian didinginkan selama 30 menit dan volume air dibaca pada skala dengan ketelitian 0,05 mL. Kadar air dihitung dalam persen (%) berdasarkan rumus (4) (WHO, 2011:33-35).

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{ml air} \times \text{BJ air}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\% \quad (4)$$

#### 4.6.3. Penetapan kadar abu

Pengujian kadar abu terdiri dari penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam dan penetapan kadar abu larut air.

##### a. Penetapan kadar abu total

sebanyak 2-4 gram simplisia digerus dan ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam wadah (platina atau krus silikat) yang telah dipijarkan dan ditara, diratakan. Selanjutnya dipijarkan secara bertahap untuk meningkatkan panas (500-600°C) hingga putih (arang habis) menunjukkan tidak adanya karbon. Berikutnya didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Jika dengan cara ini abu bebas karbon tidak dapat diperoleh, wadah didinginkan dan residu dilembabkan sekitar 2 mL dengan air atau larutan jenuh amonium nitrat, lalu dikeringkan pada *waterbath* sampai berat konstan. Residu yang didinginkan dalam desikator sekitar 30 menit, kemudian langsung ditimbang. Kadar abu total dihitung dalam mg per gram terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara berdasarkan rumus (5) (Depkes RI, 2000:17).

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{Berat abu (g)}}{\text{Berat bahan awal(g)}} \times 100\% \quad (5)$$

b. Penetapan kadar abu tidak larut asam

Wadah berisi abu total yang diperoleh pada penetapan kadar abu ditambahkan dengan 25 mL asam klorida encer yang ditutup dengan kaca arloji dan dididihkan dengan api kecil selama 5 menit. Kaca arloji dibilas dengan 5 mL air panas dan ditambahkan ke dalam wadah tersebut. Bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas sampai filtrat netral, dipijarkan hingga bobot tetap. Residu dibiarkan dingin dalam desikator sekitar 30 menit kemudian ditimbang langsung. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara menurut rumus (6) (Depkes RI, 2000:17).

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{Berat abu tidak larut asam(g)}}{\text{Berat bahan awal(g)}} \times 100\% \quad (6)$$

#### 4.6.4. Penetapan Bobot Jenis

Penetapan parameter standar spesifik yang dilakukan terhadap ekstrak adalah penetapan bobot jenis yang dihitung terhadap hasil yang diperoleh dari ekstraksi dengan masing-masing simplisia yang dibagi tiga kemudian dimaserasi masing-masing berdasarkan perbedaan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda yaitu berupa ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol. Penetapan bobot jenis menggunakan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C. Suhu ekstrak cair di atur terlebih dahulu sebelum dimasukkan ke dalam piknometer sampai suhu kurang lebih 20°C kemudian dihitung bobot jenis. Kemudian suhu piknometer yang telah diisi dengan ekstrak

cair tersebut di atur suhu sampai 25°C dan di hitung bobot jenis tersebut, sehingga diperoleh data piknometer kosong, piknometer dengan bobot air dan piknometer pada suhu 25°C dengan ekstrak cair. (Depkes RI, 2000:14).

#### 4.7. Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan adalah dengan cara dingin yaitu maserasi. Simplisia hasil pengeringan ditimbang, dibagi tiga dan diekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol kemudian dimasukkan ke dalam maserator dan ditunggu sampai kandungannya sudah terekstrak semua dengan penggantian pelarut selama 24 jam secara berkala. Hasil maserasi yang berupa larutan kemudian disaring sehingga didapat filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh dievaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* untuk memisahkan ekstrak dengan pelarut kemudian dimasukkan ke dalam cawan penguap untuk dipekatkan di atas *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak kental kemudian dibagi menjadi 3 bagian untuk tiap pelarut dengan kepolaran yang berbeda yaitu n-heksana, etil asetat dan metanol dengan perbandingan yang sama sehingga diperoleh ekstrak larut n-heksan, ekstrak larut etil asetat dan ekstrak larut metanol.

#### 4.8. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Terhadap setiap ekstrak yang dihasilkan, kemudian dilakukan pemantauan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pertama ekstrak diencerkan

dengan etanol 95% P, kemudian disiapkan bejana dan plat KLT yang akan digunakan. Bejana berisi campuran eluen. Eluen yang sesuai dijenuhkan dengan cara kertas saring dimasukkan ke dalam bejana lalu ditutup dengan *plastic wrap* dan dilihat sampai kertas saring terbasahi seluruhnya. Ekstrak dan senyawa pembanding yang diperoleh ditotolkan ke dalam plat KLT kemudian dimasukkan ke dalam bejana dan dilihat bercak yang dihasilkan dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Bercak yang diperoleh diukur untuk menghitung nilai Rf.

$$R_f = \frac{\text{jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{jarak garis depan dari titik awal}} \quad (8)$$

#### 4.9. Penentuan Kadar Golongan Senyawa

Golongan senyawa yang akan ditentukan kadarnya yaitu flavonoid dan tanin dengan menggunakan spektrofotometri UV-Sinar tampak.

##### 4.9.1. Penentuan Kadar Flavonoid

Pembuatan larutan standar dilakukan dengan menimbang 5 mg kuersetin dan dilarutkan dengan pelarut asam asetat glasial 5% dalam metanol sampai genap 100 ml. Kemudian ditentukan panjang gelombang maksimal pada spektrofotometri UV-Sinar tampak. Setelah diperoleh panjang gelombang maksimal, kemudian dibuat pengenceran larutan stok yaitu 3; 6; 12; 15 dan 24 ppm untuk dibuat kurva kalibrasi dengan menentukan serapan setiap larutan.

Pembuatan larutan uji pertama dengan menimbang sampel ekstrak kental setara 200 mg simplisia dimasukkan ke dalam labu alas bundar, kemudian berturut-turut ditambahkan 1 ml larutan methenamin 0,5% b/v, 20 ml aseton P dan

2 ml larutan 25% asam klorida P dalam air, dilakukan hidrolisis dengan pemanasan sampai mendidih menggunakan refluks selama 30 menit. Campuran disaring menggunakan kapas, filtrat dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml. Residu hidrolisis ditambah 20 ml aseton P untuk dididihkan kembali selama 30 menit, lakukan dua kali, saring dan campur filtrat ke dalam labu ukur 100 ml. Ditambahkan aseton P sampai tanda. Setelah labu ukur dingin, maka volume ditepatkan sampai tepat 100 ml, kocok rata. 20 ml filtrat hidrolisa dimasukkan menggunakan pipet ke dalam corong pisah, ditambahkan 20 ml air dan ekstraksi 3 kali, tiap kali menggunakan 15 ml etil asetat P, masukkan fase etil asetat dalam labu ukur 50 ml tambah etil asetat P sampai tanda. Untuk replikasi spektrometri prosedur dilakukan duplo.

Pembuatan larutan uji dan larutan aluminium klorida, larutan uji dipipet 10 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml, tambahkan 1 ml larutan aluminium klorida dan larutan asam asetat glasial 5% v/v dalam metanol P sampai tanda (Depkes RI, 2000:35).

#### **4.9.2. Penetapan Kadar Tanin**

Sebanyak 500 mg sampel ekstrak karamunting dilarutkan sampai 100 ml dengan aquadest, kemudian dipipet sebanyak 0,1 ml, kemudian sampel dimasukkan ke dalam labu ukur yang telah berisi 7,5 ml aquadest, selanjutnya ditambahkan 0,5 ml pereaksi Folin-Ciocalteu dan 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  35% dan digenapkan volume sampai 10 ml, kemudian dihomogenkan. Larutan didiamkan selama 30 menit, selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum asam tanat (Tamiselvi dkk, 2012: 3261).

#### 4.10. Analisis Data

Data percobaan dianalisis dengan menggunakan analisis variansi satu arah (one way ANOVA) dan perbedaan antara rata-rata dari masing-masing metode ditentukan dengan uji Tukey dengan menggunakan program SPSS versi 17. Nilai P lebih kecil dari 0,05 (nilai  $\alpha$ ) dianggap mempunyai perbedaan yang signifikan secara statistik (Sugiharto, 2009:1).

Dengan teknik analisis data tersebut, maka dapat dirumuskan suatu hipotesis sebagai berikut:

Hipotesis (H)

$H_0$  : -Tidak ada perbedaan terhadap kadar flavonoid atau kadar tanin total yang terhadap sampel dengan perbedaan pelarut ekstraksi n-heksan, etil asetat dan metanol.

$H_1$  : -Terdapat perbedaan terhadap kadar flavonoid atau kadar tanin total yang terhadap sampel dengan perbedaan pelarut ekstraksi n-heksan, etil asetat dan metanol.