

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Penyiapan Bahan

Penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan, determinasi dan pembuatan simplisia dengan tahapan meliputi sortasi basah, pencucian dengan air bersih, pengeringan, sortasi kering dan penyimpanan bahan.

4.1.1. Pengumpulan dan Determinasi Bahan

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun api – api (*Avicennia marina*), yang diperoleh dari daerah Balikpapan, Kalimantan Timur. Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Tujuan determinasi tumbuhan adalah untuk memastikan kebenaran dari jenis tumbuhan yang akan digunakan dalam penelitian.

4.1.2. Pembuatan Simplisia

Untuk pembuatan simplisia, daun api-api dibersihkan terlebih dahulu dengan mencuci menggunakan air bersih yang mengalir. Setelah dicuci bersih, daun ditiriskan untuk membebaskan air cucian. Kemudian bahan dikeringkan dengan diangin-anginkan. Bahan yang telah kering dihaluskan menjadi serbuk kemudian disimpan di dalam wadah kedap udara dan terlindung dari cahaya matahari.

4.2. Pemeriksaan Makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap simplisia berupa daun yang masih segar. Daun diamati secara langsung menggunakan panca indra. Bagian yang diamati meliputi tepi daun, dasar daun, ujung daun, urat daun, macam daun, lebar dan panjang daun diukur menggunakan penggaris.

4.3. Pemeriksaan Mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan dengan cara mengamati struktur daun dan fragmen khas yang terdapat dalam simplisia dibawah mikroskop serta karakteristik penanda lain.

4.3.1. Fragmen daun api-api

Pada pemeriksaan struktur daun, komponen yang diperiksa meliputi epidermis, mesofil, berkas pembuluh, stomata dan lain-lain dengan cara irisan tipis daun diletakkan pada kaca objek yang telah ditetesi dengan kloral hidrat kemudian ditutup dengan kaca penutup lalu diamati dibawah mikroskop. Untuk floroglusinol sebelum ditutup dengan kaca penutup, dikeringkan dahulu kemudian diberi HCl.

4.3.2. Fragmen serbuk daun api-api

Pemeriksaan fragmen simplisia daun api-api dengan cara teteskan 2-3 tetes reagen tertentu seperti floroglusinol HCl, I₂KI, air, kloral hidrat pada kaca objek, ditambahkan simplisia yang akan diamati, lalu ditutup dengan kaca penutup lalu diamati di bawah mikroskop.

4.4. Parameter Standar Non Spesifik Simplisia

4.4.1. Parameter Kadar Air

Pengukuran kadar air dilakukan dengan metode *azeotroph*. Metode *azeotroph* ini dapat mengukur secara langsung kadar air dari bahan uji. Tabung penerima dan pendingin dibilas dengan air. Ditimbang 20 gram serbuk daun api-api lalu dimasukkan ke dalam labu bundar yang berisi toluen yang telah dijenuhkan dengan akuades, dihubungkan ke alat. Toluena dituangkan ke dalam tabung penerima melalui alat pendingin.

Setelah toluen mulai mendidih, dilakukan penyulingan dengan kecepatan 2 tetes per detik, hingga sebagian air sudah tersuling, kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik hingga semua air tersuling. Setelah itu bagian dalam pendingin dicuci dengan toluen, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Kemudian tabung penerima pendingin dibiarkan pada suhu kamar. Jika terdapat tetesan air melekat pada tabung penerima, maka perlu di gosok dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen hingga tetesan air turun. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dalam tabung penerima dibaca, lalu kadar air dihitung (WHO, 2011: 35) :

$$\text{Kadar air} = \frac{100 \times (n1 - n)}{w} \quad (1)$$

Keterangan :

w = berat simplisia yang ditimbang dalam gram

n = jumlah air yang diperoleh dari destilasi pertama

n1 = jumlah air yang diperoleh dari destilasi kedua

4.4.2. Parameter Kadar Abu

Parameter kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal hingga terbentuknya ekstrak.

a. Penetapan kadar abu total

Dua gram serbuk daun api-api dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditimbang. Kemudian dipijarkan pada suhu 500-600°C perlahan-lahan hingga arang habis, warna putih menunjukkan tidak adanya karbon, lalu krus dipindahkan dan didinginkan dalam desikator lalu ditimbang. Jika arang tidak dapat dihilangkan, maka ditambahkan 2 mL air panas atau larutan jenuh ammonium nitrat lalu diuapkan di atas *waterbath* dan di atas *hot-plate* lalu disaring menggunakan kertas saring bebas abu. Sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama lalu dipijarkan. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan, lalu dipijarkan hingga bobot tetap, didinginkan dalam desikator selama 30 menit kemudian ditimbang. Kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara dihitung (WHO, 2011: 29)

$$\text{Kadar Abu(\%)} = \frac{\text{Berat abu}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \quad (2)$$

b. Penetapan kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 mL asam sulfat encer P (~ 70 g/ I) selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, lalu disaring dengan kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas hingga filtratnya netral, kemudian dipijarkan hingga bobotnya tetap.

Residu dibiarkan mendingin dalam desikator selama 30 menit lalu ditimbang. Kadar abu tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara dihitung. (WHO, 2011: 29).

$$\text{Kadar Abu}(100\%) = \frac{\text{Berat abu total} - \text{Berat abu tidak larut asam}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \quad (3)$$

4.4.3. Parameter Susut Pengerinan

Satu gram ekstrak dimasukkan ke dalam krus silikat yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang serbuk diratakan dalam krus, dengan cara krus digoyang-goyangkan, hingga isi merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm – 10 mm. Jika ekstrak yang diuji merupakan ekstrak kental digunakan batang pengaduk untuk meratakan. Kemudian dimasukkan ke dalam ruang pengering, tutupnya dibuka, dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Sebelum setiap dilakukan pengeringan, krus dibiarkan dingin dalam keadaan tertutup didalam eksikator hingga suhu kamar. Jika ekstrak sulit kering atau mencair pada pemanasan, ditambahkan 1 g silika pengering yang telah ditimbang setelah dikeringkan dan disimpan didalam eksikator pada suhu kamar. Silika tersebut dicampurkan secara merata pada ekstrak pada saat panas, kemudian dikeringkan kembali pada suhu penetapan hingga bobot tetap (WHO, 2011 Hal: 31).

$$\text{Susut Pengerinan} = \frac{\text{Berat awal} - \text{Berat zat yang dipanaskan}}{\text{Berat zat awal}} \times 100\% \quad (4)$$

4.5. Parameter Standar Spesifik Simplisia

4.5.1. Parameter Organoleptik

Parameter organoleptik dilakukan dengan menggunakan pancaindera, dimana bahan dideskripsikan berdasarkan bentuk, warna, bau, rasa dengan meminta bantuan 5 orang responden (Depkes RI, 2000;31).

4.5.2. Parameter Senyawa Terlarut Dalam Pelarut Tertentu

Parameter senyawa terlarut dalam pelarut tertentu bertujuan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan. Terdapat dua prosedur yang dilakukan (Depkes RI, 2000 : 31).

a. Kadar senyawa yang larut dalam air

Dua gram bahan di maserasi selama 24 jam dengan 100 mL air kloroform menggunakan labu bersumbat sambil dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Disaring filtratnya, kemudian 20 mL filtrat diuapkan dalam cawan berdasar rata, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air dihitung terhadap ekstrak awal (WHO, 2011 : 31).

$$\text{Kadar Sari Larut Air} = \frac{\text{Berat Sari}}{\text{Berat Bahan}} \times \frac{100}{20} \times 100\% \quad (5)$$

b. Kadar senyawa yang larut dalam etanol

Dua gram bahan dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol (95%) menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian didiamkan selama 18 jam. Filtrat disaring dengan cepat untuk menghindari penguapan etanol, kemudian 20 mL filtrat diuapkan hingga

kering dalam cawan yang telah ditimbang. Residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol (95%), dihitung terhadap ekstrak awal (WHO, 2011 : 31)

$$\text{Kadar Sari Larut Etanol} = \frac{\text{Berat Sari}}{\text{Berat Bahan}} \times \frac{100}{20} \times 100\% \quad (6)$$

4.6. Parameter Standar Spesifik Ekstrak

4.6.1. Parameter bobot jenis

Penetapan bobot jenis menggunakan piknometer bersih yang kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C. Suhu ekstrak cair diatur lebih kurang 20°C, dimasukkan ke dalam piknometer. Suhu piknometer yang telah diisi diatur hingga 25°C, kelebihan ekstrak cair dibuang dan ditimbang. Bobot piknometer kosong dikurangkan dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air dalam piknometer pada suhu 25°C (Depkes, 2000:14).

$$\text{Bobot jenis} = \frac{w_3 - w_1}{w_2 - w_1} \quad (7)$$

Keterangan :

- w1 = bobot piknometer kosong
- w2 = bobot piknometer + etanol
- w3 = bobot piknometer + ekstrak

4.7. Skrining Fitokimia

4.7.1. Senyawa Alkaloid

Sebanyak 2 gram serbuk daun api-api ditempatkan ke dalam mortar, lalu ditambahkan 5 mL amoniak 25% kemudian digerus dalam mortar, ditambahkan

20 mL kloroform dan digerus kuat-kuat. Campuran disaring kemudian filtrat larutan diambil sebagai larutan A. Sebagian filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan asam klorida 10% v/v. Lalu fraksi air dipisahkan sebagai larutan B. Larutan A diteteskan pada kertas saring, lalu disemprotkan dengan pereaksi Dragendroff, dan terbentuknya warna merah atau jingga pada kertas menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid. Larutan B dibagi menjadi 2 bagian di dalam tabung reaksi, tabung pertama ditambahkan pereaksi Dragendroff, dan tabung kedua ditambahkan pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan merah bata dengan pereaksi Dragendroff atau endapan putih dengan pereaksi Mayer menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid (Farnsworth,1966 : 245).

4.7.2. Senyawa Polifenolat

Sebanyak 1 gram serbuk daun api-api ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, lalu dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Kepada filtrat ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida dan timbulnya warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru-hitam hingga hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menunjukkan adanya fenolat (Farnsworth,1966 : 264).

4.7.3. Senyawa Flavonoid

Sebanyak 1 gram serbuk daun api-api ditempatkan pada gelas kimia, lalu ditambahkan 100 mL air panas dan dididihkan selama 10 menit. Kemudian campuran disaring, filtrat ditampung sebagai larutan C yang nantinya akan digunakan untuk pemeriksaan golongan senyawa flavonoid, saponin, dan kuinon.

Larutan C sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida pekat. Campuran ditambahkan amilalkohol, dikocok dengan kuat lalu dibiarkan hingga terjadi pemisahan. Terbentuknya warna dalam lapisan amilalkohol menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid (Farnsworth,1966 : 263).

4.7.4. Senyawa Saponin

Lima mL larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok selama 10 detik. Dibiarkan selama 10 menit, kemudian diamati. Terbentuknya busa 1 cm yang stabil di dalam tabung reaksi menunjukkan adanya golongan senyawa saponin. Busa tersebut masih tetap ada setelah ditambahkan beberapa tetes asam klorida (Farnsworth,1966 : 257).

4.7.5. Senyawa Kuinon

Lima mL larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan beberapa tetes larutan Natrium hidroksida 1 N. Terbentuknya warna kuning hingga merah menandakan adanya golongan senyawa kuinon (Farnsworth,1966 : 265).

4.7.6. Senyawa Tanin

Sebanyak 1 gram serbuk daun api-api ditambahkan 100 mL air panas, kemudian dididihkan selama 15 menit. Campuran kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian di dalam tabung reaksi. Kepada filtrat pertama ditambahkan larutan besi (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru atau hitam kehijauan menunjukkan adanya golongan senyawa tanin. Kepada filtrat kedua ditambahkan larutan gelatin 1%, terbentuknya endapan putih menunjukkan

adanya golongan tannin, dan kepada filtrat ketiga ditambahkan 15 mL pereaksi Steasny, lalu dipanaskan di atas penangas. Terbentuknya endapan merah muda menunjukkan adanya tannin katekat. Hasil uji filtrat ketiga disaring, kemudian dijenuhkan dengan ditambahkan natrium asetat, kemudian beberapa tetes larutan besi (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tannin galat (Farnsworth, 1966 : 264).

4.7.7. Senyawa Monoterpen dan sesquiterpen

Sebanyak 1 gram serbuk daun api-api digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat yang didapat ditempatkan di dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap hingga kering, lalu ditambahkan vanilin 10% dalam asam klorida pekat dan timbulnya warna-warna menandakan positif mengandung senyawa monoterpen dan sesquiterpen.

4.7.8. Senyawa Triterpenoid dan Steroid

Serbuk daun api-api sebanyak 1 gram digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat yang didapat ditempatkan dalam cawan penguap lalu dibiarkan mengering, kemudian ditambahkan larutan pereaksi Lieberman-Burchard dan terbentuknya warna merah ungu menandakan adanya senyawa terpenoid, sedangkan bila warnanya hijau-biru menandakan positif adanya steroid (Farnsworth, 1966 : 257-259).

4.8. Metode Ekstraksi

Serbuk daun sebanyak 500 gram diekstraksi secara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 95% sebanyak 2 liter lalu diaduk secara merata,

ditutup dengan menggunakan alumunium foil dan didiamkan selama 24 jam. Maserat pertama ditampung dan disaring, disimpan kemudian diganti dengan pelarut etanol 95% kembali. Langkah diulang hingga 3 kali pengulangan (Murtadlo dkk., 2013 : 380).

4.9. Fraksinasi dan pemantauan fraksi.

Ekstrak yang diperoleh kemudian difraksinasi menggunakan ekstraksi cair-cair dengan cara ekstrak ditambahkan HCl 2N sampai pH 2-3 lalu disaring. Filtrat diambil lalu ditambahkan etil asetat, akan terbentuk dua lapisan yaitu lapisan asam dan lapisan etil asetat. Lapisan etil asetat dipisahkan, lalu lapisan asam ditambahkan amonium hidroksida hingga pH larutan sampai 9 kemudian ditambahkan etil asetat sama banyak dan akan terbentuk dua lapisan yaitu lapisan basa dan lapisan etil asetat. Hasil fraksi etil asetat dipisahkan kemudian dipekatkan sehingga didapatkan fraksi alkaloid pekat. fraksi alkaloid yang dihasilkan dilakukan pemantauan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan penampak bercak yaitu pereaksi Dragendorff (Titis dkk., 2003 : 197)

4.10. Pembuatan Pereaksi Dragendroff.

Sebanyak 0,8 gram bismut (III) nitrat ditimbang dan dilarutkan dalam 20 mL asam nitrat 30%. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 27,2 gram kalium iodida lalu dilarutkan dalam 50 mL aquadest, kemudian kedua larutan dicampurkan dan didiamkan sampai 24 jam. Setelah 24 jam larutan disaring dan diencerkan dengan aquadest sampai 100 mL.

4.11. Pemurnian

Subfraksi yang terpilih kemudian dimurnikan secara kromatografi preparatif dengan cara fraksi yang akan dipisahkan ditotolkan berupa garis pada salah satu sisi pelat lapisan besar berukuran 20 x 20 cm dan tegak lurus pada garis cuplikan sehingga campuran akan terpisah menjadi beberapa pita. Lalu cuplikan dikembangkan dengan pelarut kloroform – metanol. Pengembangan dilakukan pada chamber penuh uap eluen agar pemisahan lebih sempurna. Pita ditampakkan dengan cara disemprotkan penampak bercak Dragendroff pada sisi kanan kiri plat dan penjerap yang menghasilkan reaksi positif alkaloid, dikerok dari pelat kaca. Hasil dimasukkan ke dalam vial lalu ditambahkan pelarut metanol ke dalamnya, lalu larutan disaring hingga silika gel terpisah. Filtrat kemudian diuapkan hingga diperoleh kristal (Gritter dkk., 1991 : 140).

4.12. Uji Kemurnian

Uji kemurnian isolat dilakukan dengan dua metode yaitu kromatografi lapis tipis pengembang tunggal (KLT pengembang tunggal) dan kromatografi lapis tipis dua dimensi (KLT dua dimensi).

4.12.1. KLT pengembang tunggal

KLT pengembang tunggal dilakukan dengan menyiapkan 3 plat KLT yang berukuran 2 x 10 cm. Cuplikan ditotolkan pada masing-masing plat, kemudian dikembangkan dengan eluen yang tingkat kepolarannya berbeda. Pada plat pertama eluen yang digunakan sebagai pengembang yang bersifat polar yaitu

kloroform-metanol dengan perbandingan 1,4:8,6. Pada plat kedua eluen yang digunakan sebagai pengembang yang bersifat semi polar yaitu kloroform : metanol dengan perbandingan 8,6:1,4. Pada plat ketiga eluen yang digunakan sebagai pengembang yang bersifat non polar digunakan n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 9:1 (Gritter dkk., 1991: 175-176).

4.12.2. KLT dua dimensi

Kristal yang diperoleh dari hasil isolasi dilakukan uji kemurnian secara KLT dua dimensi ukurannya 10 x 10 cm menggunakan fase gerak kloroform : metanol, sebagai fase diam adalah silika gel GF₂₅₄. Bercak yang dihasilkan pada pengembangan pertama dikeringkan terlebih dahulu, sebelum dilakukan pengembangan dengan metanol. Hasil pengembangan membuktikan bahwa tidak ada bercak, lalu dilakukan pengembangan kedua dengan metanol. (Hasibuan dan Nainggolan, 2007 : 21).

4.13. Identifikasi Isolat Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Kristal hasil isolasi dilarutkan dalam pelarut metanol kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 200-600 nm (Hasibuan dan Nainggolan, 2007 : 21).

4.14. Identifikasi Isolat Menggunakan Spektrofotometer FTIR

Preparasi sampel cairan dengan cara dipipet sampel kemudian ditetaskan ke dalam sel infra merah window kristal CaF₂. Setelah itu ditempatkan dalam

holder atau wadah sampel dalam alat spektrofotometri FTIR yang selanjutnya dianalisis. Hasil spektrum kemudian dibandingkan dengan pustaka (Sari., 2011 : 26)

