

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama Januari - Maret 2019 di Laboratorium Bahan Alam Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Rotary evaporator (Eyela), timbangan analitik, maserator, oven (Gemmyco), *waterbath* (Memmer), tanur (Naberthem), desikator, tabung reaksi, gelas ukur, beaker glass, corong, cawan penguap, pipet tetes, spatula, batang pengaduk, *chamber*, vial, seperangkat alat destilasi, krus, plat KLT, kertas saring bebas abu, penangas air, ultra violet lamp.

3.2.2 Bahan

Aquadest, etanol 96%, metanol, kloroform, etil asetat, n-heksana, pereaksi dragendrof, Mg stearat, HCl pekat, NaOH, FeCl₃ 1%, KOH, H₂SO₄, eter, vanillin 10%, Libermann Buchard.

3.3 Prosedur Penelitian

Standarisasi dari ekstrak etanol kulit batang Kawista dilakukan melalui beberapa tahapan penelitian yang meliputi:

3.3.1 Persiapan Bahan Uji

A. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Insitut Teknologi Bandung di Fakultas STIH (Sekolah Ilmu Tinggi Hayati) Bandung, Jawa Barat

B. Pembuatan Simplisia

Kulit batang kawista yang didapatkan dari Desa Tempuran 1 Kecamatan Tempuran Kabupaten Karawang dilakukan sortasi dan bahan yang dianggap baik dicuci hingga bersih menggunakan air mengalir untuk menghilangkan debu dan kotoran yang menempel, lalu diangin-angin kemudian dikeringkan dengan oven. Bahan yang telah kering dengan parameter kadar air <10%, dibuat dalam bentuk serbuk.

C. Pembuatan Ekstrak

Maserasi dilakukan dengan cara merendam 1 bagian serbuk simplisia dengan 10 bagian pelarut etanol 96%. Pengadukan dilakukan selama 6 jam dan diendapkan 24 jam. Setelah 24 jam, dilakukan penyaringan, filtrat disisihkan dan residu ditambah kembali dengan 10 bagian pelarut etanol 96%. Campuran diaduk kembali selama 6 jam dan diendapkan 24 jam. Proses ini dilakukan sebanyak 3x kemudian dilakukan pengentalan untuk mendapatkan ekstrak kental menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C.

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Berat simplisia yang diekstrak (g)}} \times 100\%$$

3.3.2 Standarisasi Ekstrak Etanol

A. Parameter spesifik.

1) Organoleptik

Mendeskrripsikan organoleptik ekstrak kulit batang kawista meliputi bentuk, warna, bau dan rasa (Depkes RI, 2000).

2) Senyawa Terlarut Dalam Pelarut Tertentu

a) Penetapan Kadar Sari Larut Air

Ditimbang 5 g simplisia, kemudian dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml aquadest menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Ekstrak disaring, kemudian diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara. Setelah itu residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (MMI, 1989).

$$\text{Kadar Sari Larut Air} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times \frac{\text{Volume Pelarut}}{\text{Volume Filtrat}} \times 100\%$$

b) Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Ditimbang 5 g simplisia, kemudian dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol 96% menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Ekstrak disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol, kemudian diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara. Setelah itu residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar air dihitung dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (MMI, 1989).

$$\text{Kadar Sari Larut Etanol} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times \frac{\text{Volume Pelarut}}{\text{Volume Filtrat}} \times 100\%$$

3) Uji Kandungan Kimia

a) Pola Kromatogram

Ekstrak ditimbang, diekstraksi dengan pelarut tertentu, kemudian dianalisis kromatografi sehingga memberikan pola kromatogram yang khas (Depkes RI, 2000).

b) Skrining Fitokimia

1. Identifikasi Alkaloid

Ekstrak 1 ml ditambahkan 2 ml asam klorida, lalu dipanaskan selama 5 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah 2 sampai 3 tetes pereaksi Dragendrof. Adanya senyawa alkaloid ditunjukkan dengan endapan jingga (Halilah, A. Nila, dkk., 2017).

2. Identifikasi Flavanoid

Sebanyak 2 ml sampel ditambahkan dengan 0,1 gram mg stearat dan 5 tetes HCl pekat. Jika terbentuk warna kuning, jingga sampai merah, maka positif mengandung flavanoid (Halilah, A. Nila, dkk., 2017).

3. Identifikasi Kuinon

Sejumlah ekstrak digerus dan dipanaskan dengan aquadest, kemudian disaring, filtrat ditetesi dengan larutan NaOH. Terbentuknya warna kuning hingga merah menunjukkan adanya senyawa kuinon (Fikayuniar, 2017).

4. Identifikasi Tanin

Sebanyak 2 ml sampel dipanaskan kurang lebih 5 menit pada suhu 50 °C. Ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1 %. Jika larutan terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman maka positif mengandung tanin (Halilah, A. Nila, dkk., 2017).

5. Identifikasi Fenolik

Sebanyak 2 ml sampel ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1%. Jika larutan terjadi perubahan warna menjadi lebih hitam maka positif mengandung fenolik (Halilah, A. Nila, dkk., 2017).

6. Identifikasi Saponin

Sebanyak 2 ml sampel dilarutkan dalam aquadest pada tabung reaksi ditambah 10 tetes KOH dan dipanaskan dalam penangas air suhu 50 °C selama 5 menit, kemudian dikocok selama 15 menit. Jika terbentuk busa setinggi 1 cm dan tetap stabil selama 15 menit berarti menunjukkan adanya senyawa saponin (Halilah, A. Nila, dkk., 2017).

7. Identifikasi Steroid dan Triterpenoid

Sebanyak 2 ml sampel ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat. Jika larutan terbentuk warna hijau maka positif mengandung steroid. Jika larutan terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid (Halilah, A. Nila, dkk., 2017).

8. Identifikasi Monoterpenoid dan Sesquiterpenoid

Sejumlah ekstrak digerus dengan eter, kemudian dipipet sambil disaring. Filtrat ditambahkan larutan vanilin 10% dalam asam sulfat pekat. Terjadinya warna-warna menunjukkan adanya senyawa monoterpenoid dan sesquiterpenoid (Nurhari, 2010).

B. Parameter Non Spesifik

1) Penetapan Susut Pengerinan

Sebanyak 1 g sampai 2 g ekstrak ditimbang dalam cawan yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang ekstrak diratakan dengan bantuan batang pengaduk hingga lapisan setebal 5 mm sampai 10 mm. Kemudian dimasukkan ke dalam oven, dikeringkan pada suhu 105°C selama 30 menit. Sebelum setiap pengeringan, biarkan cawan mendingin dalam desikator hingga suhu kamar. Setelah dikeringkan dan disimpan pada suhu kamar kemudian timbang. Ulangi perlakuan sampai didapat bobot tetap kemudian catat yang diperoleh untuk memperoleh presentase susut pengeringannya (Depkes RI, 2000).

$$\text{Susut Pengerinan} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

Keterangan : A = Berat Sampel Sebelum dipanaskan (g)

B = Berat Sampel Setelah dipanaskan (g)

2) Penetapan Bobot Jenis

Penetapan bobot jenis ekstrak dilakukan pada ekstrak kulit batang kawista. Pertama-tama vial ditara dengan 5 ml air. Selanjutnya vial kosong ditimbang (W0). Kemudian ekstrak dengan konsentrasi 1 % dimasukkan ke dalam vial sampai tanda tara dan ditimbang bobotnya (W1). Bobot jenis air diasumsikan sama dengan 1.

$$\text{Bobot Jenis (g/mL)} = \frac{W1 \text{ (g)} - W0 \text{ (g)}}{5 \text{ ml}}$$

3) Penetapan Kadar Air dengan Cara Destilasi

Dimasukkan serbuk simplisia yang ditimbang seksama sebanyak 5 g yang diperkirakan mengandung 2-4 ml air kedalam labu kering. Dimasukkan lebih kurang 200 ml toluen P yang dijenuhkan dengan air kedalam labu. Tabung pendingin dan tabung penerima yang sudah dibersihkan dan dikeringkan, dihubungkan dengan labu, kemudian labu dipanaskan selama 15 menit dengan hati-hati. Setelah toluen mendidih, disuling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes/detik, hingga sebagian besar air tersuling. Kemudian dinaikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, dicuci bagian dalam pendingin dengan toluen, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambung pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluen. Dilanjutkan penyulingan selama 5 menit. Tabung penerima dibiarkan hingga suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca. Jika ada tetesan air yang melekat pada dinding tabung penerima, digosok dengan karet yang diikat pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen hingga tetesan air turun. Kadar air dihitung terhadap bahan awal %v/b (Ditjen POM, Dekes RI, 2000).

$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{Jumlah air pada tabung penerima}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

4) Penetapan Kadar Abu

a) Penetapan Kadar Abu Total

Sejumlah 3 g serbuk simplisia yang telah digerus dan ditimbang seksama, dimasukkan kedalam krus silikat atau krus platina yang telah dipijarkan dan ditara, lalu serbuk diratakan. Krus dipijarkan perlahan-lahan hingga suhu 500-600°C hingga arang habis atau abu habis, selanjutnya didinginkan dalam desikator selama 10 menit dan ditimbang hingga bobot tetap. Dihitung kadar abu dalam persen terhadap simplisia yang telah dikeringkan di udara (MM1, 1989).

$$\text{Kadar Abu Total} = \frac{\text{Berat abu total}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

b) Penetapan Kadar Abu Larut Air

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total didihkan dengan 25 ml air panas selama 5 menit, disaring melalui penyaring kaca masir atau kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, kemudian dipijarkan pada suhu lebih kurang 450°C, kemudian ditimbang hingga bobot tetap. Dihitung kadar abu larut air dihitung dalam persen terhadap simplisia yang telah dikeringkan di udara (MM1, 1989).

$$\text{Kadar Abu Larut Air} = \frac{\text{Berat abu total} - \text{Berat abu larut air}}{\text{Bobot Ekstrak}} \times 100\%$$

c) Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, didihkan dengan 25 ml asam klorida pekat selama 5 menit, dikumpulkan bagian yang tidak larut asam, disaring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijar pada kompor selama 15 menit, kemudian pemijaran dilanjutkan pada oven dengan suhu lebih kurang 450°C hingga bobot tetap, kemudian ditimbang. Dihitung kadar abu yang tidak larut asam dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (MM1, 1989).

$$\text{Kadar Abu Tidak Larut Asam} = \frac{\text{Berat abu tidak larut asam}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

3.4 Diagram Alir Penelitian

