

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini yaitu herba tespong (*Oenanthe javanica* (Blume) DC) yang didapatkan dari daerah Lembang, kabupaten Bandung. Bahan lain yang digunakan yaitu n- heksana (Teknis), etil asetat (Teknis) dan etanol 70% (Teknis) sebagai pelarut ekstraksi bertingkat, Pereaksi seperti *Dragendorf*, *Mayer*, *Lieberman bunchart*, $FeCl_3$,amil alkohol, Ammonia, kloroform, asam klorida (HCl), eter, sitroborat, Natrium Asetat, NaOH, metanol dan Mg. Untuk standarisasi yaitu aquadest, etanol 95% (p.a), kloroform (p.a), Absorben yang digunakan yaitu silika gel 60 F₂₅₄ (0,63 – 0,200 mm), plat KLT yang digunakan DC-Alufoilen Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck, alumunium foil, kapas dan kertas saring.

3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat destilasi, maserator, *rotary evaporator* (Heidolph Laborata 4000), *Waterbath*, alat kromatografi kolom, oven (gemmyco digital yco-noi), *chamber*, neraca analitik (ae-ADAM), pipa kapiler, plat KLT, gelas ukur, *beaker glass*, rak tabung reaksi, tabung reaksi, penjepit kayu, cawan penguap, krus, spatula, batang pengaduk, pipet tetes, tanur (Thermo) , lampu UV(λ 254 dan λ 366 nm). Untuk proses isolasi dengan alat spektrofotometer Ultraviolet Visibel (Thermo) dan kuvet(Purshee™) .

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Buana Perjuangan Karawang pada bulan Februari – Agustus 2020.

3.4 Prosedur Penelitian

Adapun prosedur penelitian meliputi determinasi tanaman, penyiapan sampel pengolahan sampel menjadi serbuk halus, ekstraksi, fraksinasi dan identifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV – Visibel.

3.4.1 Determinasi Sampel

Pemeriksaan atau determinasi tanaman herba tespong dilakukan di Pusat Penelitian Biologi - LIPI, Bogor, Jawa Barat.

3.4.2 Penyiapan Sampel

Sampel diperoleh dari daerah Lembang, Kabupaten Bandung, sampel diolah menjadi simplisia melalui tahap – tahap diantaranya pengumpulan bahan, sortasi basah, pencucian, pengubahan bentuk, pengeringan, sortasi kering dan penyimpanan.

3.4.3 Pengolahan Sampel

Pengumpulan bahan baku yaitu herba tespong (*Oenanthe javanica* (Blume) DC) dipanen kemudian disortasi basah agar terpisah dari bahan-bahan asing yang tidak dibutuhkan lalu dibersihkan terlebih dahulu untuk menghindari kotoran dan mikroba yang menempel pada bahan selanjutnya dilakukan pengubahan bentuk atau perajangan dengan cara serut tipis dan dikeringkan di pengeringan, sampel yang telah kering disortasi kembali kemudian dihaluskan hingga menjadi serbuk.

3.4.4 Skrining Fitokimia

A . Uji kandungan alkaloid

Sampel dibasakan terlebih dahulu dengan ammonia encer, digerus dalam mortir kemudian ditambahkan beberapa ml kloroform sambil terus digerus. Lalu disaring dan filtratnya dikocok dengan asam klorida (HCl) 2 N. Selanjutnya lapisan asam dipisahkan dan dibagi menjadi tiga bagian, bagian pertama digunakan sebagai blanko, bagian kedua ditetesi pelarut pereaksi *Mayer*, kemudian diamati warna yang muncul ada atau tidaknya endapan putih, bagian ketiga ditetesi larutan pereaksi *Dragendorf*, lalu diamati kembali ada atau tidak endapan hingga coklat (Harborne, 1987).

B. Uji kandungan flavonoid

Sampel dipanaskan, kemudian ditambahkan serbuk magnesium (Mg) dan asam klorida (HCl) 5 N, lalu disaring. Filtrat merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol menandakan adanya kandungan flavonoid (Harborne, 1987).

A. Uji kandungan steroid

Sampel disari dengan eter, kemudian sari eter tersebut diuapkan hingga kering. Setelah terbentuk residu ditetesi pereaksi *Liebermann- Buchard*. terbentuknya warna biru – hijau menunjukkan adanya senyawa steroid (Harborne, 1987).

B. Uji kandungan saponin

Sampel dicampur dengan air di dalam tabung reaksi dan dipanaskan diatas penangas air beberapa saat, kemudian disaring. Lalu filtrat dikocok kuat – kuat selama kurang lebih 30 detik. Terbentuknya busa sekurang- kurangnya 1 cm dan persisten selama beberapa menit serta tidak hilang setelah penambahan 1 tetes asam klorida encer menunjukkan adanya senyawa saponin (Harborne, 1987).

C. Uji kandungan terpenoid

Uji kandungan triterpenoid, sampel disari dengan eter, kemudian sari eter tersebut diuapkan hingga kering. Setelah terbentuk residu ditetesi pereaksi *Liebermann- Buchard*. Terbentuknya warna ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid (Harborne, 1987).

D. Uji kandungan tanin

Sampel digerus dan dipanaskan dengan air diatas penangas air, kemudian disaring dalam keadaan masih panas. Lalu filtrat dibagi menjadi dua bagian, bagian pertama ditetesi larutan besi (III) klorida akan terbentuk reaksi berwarna biru- hitam yang menunjukkan adanya tanin dan polifenol alam, bagian kedua ditambahkan larutan gelatin 1% terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya senyawa tanin (Harborne, 1987).

E. Uji kandungan kuinon

Sampel ditetesi beberapa larutan natrium hidroksida, terbentuknya warna merah menunjukkan adanya senyawa kuinon (Harborne, 1987).

3.4.5 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi bertingkat dengan sampel serbuk simplisia herba tespong, pelarut yang digunakan adalah pelarut dengan kepolaran makin meningkat yaitu n-heksan, etil asetat dan etanol masing – masing pelarut yang digunakan sebanyak 100 ml (1:10). Serbuk simplisia herba tespong di timbang kemudian dimasukkan ke dalam bejana maserasi. Maserasi pertama simplisia direndam dengan pelarut n-heksan selama 24 jam sesekali diaduk, setelah 24 jam residu di pisahkan dari filtrat dan ampas simplisia dikeringkan dengan oven pada suhu yang sesuai. Setelah residu kering dimaserasi kembali selama 24 jam dengan pelarut etil asetat sambil sesekali diaduk pula, setelah 24 jam residu dipisahkan dari filtrat lalu dikeringkan, selanjutnya dimaserasi kembali dengan pelarut etanol dengan prosedur yang sama. Ekstrak yang diperoleh di pekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental, lalu hitung rendemen dan dilakukan pengujian selanjutnya (Permadi, 2015)

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

3.4.6 Uji Parameter Non Spesifik

A. Susut pengeringan

Penentuan susut pengeringan dilakukan menggunakan metode gravimetri yaitu dengan memasukkan 10 gram ekstrak dan timbang dalam wadah yang telah ditara. Kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Lanjutkan pengeringan dan timbang kembali pada jarak 1 jam hingga bobot konstan (Depkes, 2000).

B. Penetapan kadar abu total

lebih kurang 2 sampai 3 gram ekstrak digerus dan ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, ratakan. Dipijarkan perlahan hingga arang habis, dinginkan dan ditimbang (Depkes, 2000).

3.4.7 Uji Parameter Spesifik`

A. Identitas

Pendeskripsian tata nama diantaranya nama ekstrak, nama latin tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan dan nama Indonesia tumbuhan (Depkes, 2000).

B. Organoleptik

Penetapan organoleptik dengan penggunaan pancaindera dalam mendeskripsikan bentuk, warna rasa dan bau ekstrak (Depkes, 2000).

C. Kadar senyawa yang larut dalam air

Maserasi sebanyak 0,5 gram ekstrak selama 24 jam dengan 100 ml air kloroform menggunakan labu bersumbat sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring, sebanyak 20 ml filtrat yang dihasilkan diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal yang telah ditara, lalu residu dipanaskan pada suhu 105° C hingga bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen senyawa yang larut air, terhadap ekstrak awal (Depkes, 2000).

D. Kadar senyawa yang larut dalam etanol

Maserasi sebanyak 0,5 gram ekstrak selama 24 jam dengan 100 ml etanol (95%) menggunakan labu bersumbat sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring, sebanyak 20 ml filtrat yang dihasilkan diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal yang telah ditara, lalu residu dipanaskan pada suhu 105° C hingga bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol, terhadap ekstrak awal (Depkes, 2000).

3.4.8 Fraksinasi

Fraksinasi dapat dilakukan dengan metode analisis yaitu kromatografi seperti Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Kolom (KK). Hasil yang diperoleh dari proses fraksinasi adalah fraksi (Irda and Ruslan, 2014). Adapun proses dari kromatografi lapis tipis yaitu lempeng alumunium silika di siapkan dengan ukuran tertentu, ekstrak kental dilarutkan lalu ditotolkan pada lempeng tepi bawah. Lempeng dimasukkan kedalam eluen yang sesuai, biarkan terelusi oleh eluen hingga tepi lempeng dikeluarkan dan dikeringkan. Pengamatan noda dilakukan menggunakan lampu UV 254 dan 366 nm.

Proses kromatografi kolom yaitu mula – mula leher kolom disumbat dengan kaca wol atau kapas, sumbatan harus terendam oleh pelarut pengelusi tingginya sekitar 10 cm. kemasan kolom dijadikan bubur dengan pelarut yang sama dalam wadah lalu dituangkan kedalam kolom kemudian menempatkan cuplikan atau ekstrak diatas kolom yang berisi kemasan kolom kemudian dielusi beruntun setiap komponen dengan pelarut yang cocok perlakuan tersebut harus dilakukan secara hati – hati agar permukaan kemasan tidak terganggu dan hasil nya ditampung menggunakan vial yang telah dikalibrasi (Markham, 1988).

3.4.9 Identifikasi isolat secara Spektrofotometri UV- Visibel

Karakterisasi isolat dianalisis dengan spektrofotometri UV-Visibel . Isolat yang diperoleh dimasukkan kedalam kuvet spektrofotometer UV-Visibel untuk diidentifikasi nilai absorbansi suatu senyawa metabolit sekunder dari isolat tersebut dengan panjang gelombang tertentu

