

## **BAB V PEROSSEDUR PENELITIAN**

### **5.1. Penyiapan Bahan**

Pada penelitian ini ada beberapa tahapan yang harus dilakukan yaitu pengumpulan bahan determinasi dan pengolahan bahan.

### **5.2. Pengumpulan bahan**

Bahan tumbuhan yang digunakan yaitu daun sirih hitam daun sirih merah (*Piper crocatum*), daun sirih hijau (*Piper battle* L.). Sirih hitam (*Piper sp.*) dan daun sirih cina (*Peperolina pellucida* L. kunth) yang diperoleh dari daerah Aceh Tenggara - Sumatra Utara.

### **5.3. Determinasi Tanaman**

Tanaman di determinasikan dilakukan di Departemen Biologi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Matematika IIMU Pengetahuan Alam Universita Padjajaran Bandung.

### **5.4. Pengolahan Simplisia**

Proses pengolahan bahan diantaranya adalah sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering dan penyimpanan.

#### **5.4.1. Pencucian Basah**

Proses pencucian dilakukan menggunakan air yang bertujuan agar seluruh kotoran yang melekat baik tanah, debu dan pengotoran lainnya dapat hilang dari bahan simplisia.

#### **5.4.2. Perajangan**

Pada proses perajang yang bertujuan untuk memperluas permukaan tubuh. Semakin luas permukaan maka bahan akan semakin cepat kering, permukaan kering pun akan rata

#### 5.4.3. Pengeringan

Proses pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu 40-45°C. Pengeringan bertujuan untuk menurunkan kadar air yang terkandung didalam daun sehingga bahan baku yang tidak mudah di penuhi kapang atau bakteri. Proses pengeringan dilakukan selama 3 hari. Proses selanjutnya adalah penggilingan daun dilakukan dengan cara diblender.

#### 5.4.4. Penyimpanan

Setelah simplisia dihaluskan menggunakan blender khusus, kemudian simplisia masukan ke dalam wadah tertutup dan terhindar dari cahaya matahari.

### 5.5. Karakteristik Simplisia

Karakteristik simplisia yaitu meliputi penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu larut air, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, penetapan kadar air dan susut pengeringan.

#### 5.5.1 Pengujian Makroskopik dan Mikroskopik

Pengujian makroskopik meliputi pemeriksaan bentuk, warna, ukuran, dan aroma pada duan sirih. Sedangkan pengujian mikroskopik dilakukan dengan cara meletakkan serbuk simplisia daun dan buah di atas object glass yang ditetesi oleh kloralhidrat 70%.

#### 5.5.2 Penetapan Kadar Air

Metode Destilasi ditimbang sebanyak 10 gram serbuk simplisia daun sirih. Dituangkan pada krus yang sudah ditara, lantas keringkan dengan suhu 105°C selama 5 jam, lalu ditimbang. Dilakukan pengeringan lanjutanserta ditimbang pada selang waktu 1 jam hingga terjadinya variasi diantara dua penimbangann berurutan kurang dari 0,25% (FHI 2017).

$$\text{Kadra Air} = \frac{\text{bobot basah} - \text{bobot sampel kering}}{\text{bobot sampel basah}} \times 100 \%$$

### 5.5.3. Penetapan Kadar Abu Total

sampel dalam bentuk simplisia yang telah ditimbang seksama hingga bobot 2-3 gram bahan uji yang telah dihaluskan masukan kedalam krus silikat yang sebelumnya telah dipanaskan dan timbang, kemudian sampel dipijarkan pada suhu  $800 \pm 25^\circ$  hingga arang habis dinginkan lalu timbang hingga bobot konstan.

Apabila masih terdapat arang, tambahkan dengan air panas, aduk dan saring oleh kertas saring bebas abu. Pijarkan kembali sisa penyaringan dan kertas saring di dalam krus yang sama. Tuangkan filtrate dalam krus, diuapkan dan pijarkan sampai bobot konstan. Kadar abu total dihitung berdasarkan berat badan uji, dinyatakan dalam % b/b (Kementerian Kesehatan RI, 2017).

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{bobot abu}}{\text{bobot ekstrak}} \times 100 \%$$

### 5.5.4. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Didihkan abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit . Kemudian kumpulkan bagian yang sukar larut dalam asam, saring melalui kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijarkan dalam krus hingga bobot tetap hingga bobot tetap pada suhu  $800 \pm 25^\circ$ . Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Farmakope Herbal Edisi II, 2017).

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{berat abu tak larut asam}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

### 5.5.5. Penetapan Kadar Sari Larut Air

Simplisia yang telah dikeringkan diserbukkan ditimbang sebanyak 5 gram, masukan kedalam labu bersumbat, tambahkan pelarut 100 mL air kloroform, dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama secara berulang, diamkan pada 18 jam. selanjutnya saring dan uapkan 20 mL filtrate hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang sebelumnya sudah dipanaskan hingga  $105^\circ\text{C}$ , timbang hingga kering dan panaskan residu hingga berat konstan pada suhu  $105^\circ\text{C}$ . Hitung

persentase kandungan sampel larut dalam air. Kemudian hitung kandungan ekstrak larut air (Kementerian Kesehatan RI, 2017).

$$\text{Kadar sari} = \frac{\text{berat sari (gram)}}{\text{berat sample (gram)}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

#### 5.5.6. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Sampel yang telah dikeringkan kemudian ditimbang sebanyak 5 gram serbuk yang telah dikeringkan, masukan kedalam labu bersumbat dalam pelarut etanol P sebanyak 100 mL sesekali kocok 6 jam pertama secara berulang. Di biarkan selama 18 jam, saring secara cepat untuk menghindari penguapan etanol, kemudian filtrat diuapkan sebanyak 20 mL, menggunakan cawan dangkal beralas datar yang sebelumnya sudah dipanaskan pada suhu 105°C dan ditara, panaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot konstan. Hitung kadar dalam % sari larut etanol (Kementerian Kesehatan RI, 2017).

$$\text{Kadar sari} = \frac{\text{berat sari (gram)}}{\text{berat sample (gram)}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

#### 5.5.7 Penetapan Susut Pengering

Dilakukan penggunaan alat moisture balance. Sebanyak 2 gram serbuk simplisia daun dituangkan kedalam alat moisture balance di atur pada suhu 105°C dengan waktu otomatis, lalu tunggu hingga bobot konstan. Baca dan catat hasil pengukuran (Bestari dkk, 2016).

### 5.6 Proses Pembuatan Ekstraksi

Simplisia daun sirih yang di proleh kemudian dihaluskan, sebanyak 100 gram simplisia daun sirih kemudian masukan kedalam alat rafluks menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandinagn 1:5 selama 1-4 jam, kemudian ekstraksi hasil refluks disaring dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator dengan temperature 50°C sehingga didapatkan ekstrak pekat.

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{boobot simlisia akhir (gram)}}{\text{bobot simplisia awal (gram)}} \times 100$$

## **5.7. Skrining Fitokimia**

Skrining fitokimia merupakan identifikasi alkaloid, identifikasi flavonoid, identifikasi saponin, identifikasi kuinon, identifikasi tanin dan identifikasi steroid/triterpenoid.

### **5.7.1. Uji Alkaloid**

Jumlah sampel masukan dalam mortir kemudian digrus, dibasakan menggunakan ammonia sebanyak 1 mL, dan ditambahkan kloroform sebanyak 20 mL, kemudian di grus kembali. Larutan serbuk kemudian disaring dan dipisahkan filtratnya dalam bentuk reaksi, ditambahkan HCl 2N, dikocok. Selanjutnya dibiarkan menjadi pemisahan. Siapkan tabung reaksi terpisah untuk pengujian:

Tabung 1: dimasukan sejumlah filtrat, ditambahkan 1 tetes preaksi dragendrof. Senyawa alkaloid yang teridentifikasi akan menunjukkan perubahan warna menjadi merah atau jingga, atau terdapat endapan berwarna putih.

Tabung 2: dimasukan sejumlah filtrat, ditambahkan 1 tetes preaksi Mayer. Senyawa alkaloid yang teridentifikasi akan ditunjukkan dengan adanya endapan atau keruhan putih.

Tabung 3: ditunjukan sebagai kontrol negatif atau blanko (Farnsworth, 1966).

### **5.7.2. Uji Flavonoid**

Pada tabung reaksi dimasukan sampel sebanyak 2 mL aquades, jumlah kecil logam magnesium serta 5 tetes HCl 2 N kemudian dicampur dikocok dan dipanaskan selama 5-10 menit. Setelah dipanaskan lalu dilakukan penyaringan dan filtrat didinginkan dan ditambahkan amil alkohol, dikocok dengan kuat. Adanya senyawa flavonoid ditunjukan dengan terjadinya perubahan warna menjadi merah hingga terdapat lapisan amil alkohol (J.B.harbone, 1973).

### **5.7.3. Uji Kuinon**

Timbang sebanyak 1 gram sampel, didihkan dengan 100 mL, air panas selama 5 menit, kemudian saring 5 mL filtrat tambahkan beberapa tetes larutan natrium hidroksida N, reaksi menghasilkan warna merah menunjukkan kuinon positif

namun, reaksi positif palsu dapat terjadi. Kemudian tambahkan agar - agar untuk memeriksa, lalu saring. Kemudian tambahkan NaOH, jika terus terbentuk warna merah maka positif kuinon (Farnsworth 1966).

#### **5.7.4. Uji Tanin**

Masukkan serbuk sampel kedalam tabung reaksi lalu tambahkan sebanyak 10 mL air, selama campurkan dengan beberapa tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1%, jika terbentuk warna biru tua atau hijau atau hitam dapat disimpulkan bahwa sampel mengandung senyawa golongan tanin (Farnsworth, 1966).

#### **5.7.5. Uji Saponin**

Sampel dilarutkan dengan air, dididihkan 30 menit kemudian disaring, pidahkan filtrat dan biarkan dingin. Filtrat dikocok kuat dalam wadah selama 10 detik secara virtual. Terdapat hasil buih yang konsisten selama 5-10 menit berukuran + 1 cm dan tidak hilang saat ditambahkan beberapa tetes asam klorida menandakan bahwa terdapat senyawa golongan saponin (Farnsworth, 1966).

#### **5.7.6. Uji Steroid dan Triterpenoid**

Sampel yang telah di timbang dengan eter digrus dalam mortir, lalu bagian eter dimasukan kedalam cawan dan diuapkan hingga mengering, tetes resiau dengan pereaksi liebermann-burchard. Adanya perubahan warna menjadi merah-ungu menunjukkan positif kandungan senyawa triterpenoid dan bila terjadi perubahan warna menjadi hijau-biru menunjukkan terdapat senyawa steroid (Farnsworth, 1966).

#### **5.8. Pemantauan Ekstrak**

Pemantauan ekstrak dengan menggunakan plat silica GF254 sebagai fase diam. Sedangkan fase gerak dari yang polar, semi polar, dan non polar. Digunakan polar kloroform-metanol-air (7:2:3tts), untuk daun sirih hujau, kloroform –etil asetat (7:2), untuk daun sirih hitam, semi polar non polar n-heksan-etil asetat (6:2) untuk

daun sirih merah dan daun sirih Cina. Dengan fase diam digunakan adalah silika Gel F254 dengan penampak bercak sinar UV254 dan UV366. Serta dilakukan penyemprotan penampak bercak yaitu menggunakan  $\text{AlCl}_3$  10%,  $\text{FeCl}_3$  10%, larutan DPPH 0,2% dalam metanol,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10% dalam metanol. Campuran fase gerak dijenuhkan terlebih dahulu ke dalam chamber kemudian ditutup rapat sekam 10 hingga 15 menit agar fase gerak etrcampur sempurna. Kemudian ekstrak ditotolkan di plat yang sebelumnya dielusi dengan campuran fase gerak. Plat dimasukkan pada chamber yang berisi fase gerak dan ditutup rapat hingga fase geraknya sampai jarak  $\pm 0,5$  cm batas alat plat. Selanjutnya plat di ambil dan dikeringkan di udara terbuka, amati dibawah sinar UV 254 dan 366 nm. Setelah itu hitung nilai  $R_f$  dari masing masing ekstrak dan diamati warna yang muncul (FHI, 2017)

## **5.8. Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH**

### **5.8.1. Uji Aktivitas Antioksidan**

Menggunakan klt secara kualitatif bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam sampel yang dilihat berdasarkan kepolaran, untuk mengetahui pemisahan berdasarkan sifat kepolarannya dan untuk mengetahui aktivitas antioksidan secara kualitatif menggunakan pengembangan yaitu polar etil asetat-asam format-air, semipolar chloroform- methanol dan nonpolar toluene-etil asetat. Fase diam yang digunakan yaitu silika gel F<sub>254</sub>. Kemudian disemprotkan menggunakan pelarut DPPH 0,2% dalam etanol. Aktivitas antioksidan dari ekstrak akan memberikan warna kuning dan latar belakang ungu dari DPPH.

### **5.8.2. Uji Kuantitatif Antioksidan**

#### **a. Pembuatan larutan stok DPPH**

Larutan induk 100 ppm, dengan menimbang 5 mg DPPH dilakukan 50 mL etanol p.a, dikocok hingga homogen dan disimpan di dalam botol gelap. Penentuan konsentrasi DPPH dibuat seri pengenceran kemudian dicari Panjang gelombangnya dengan 515-520nm. Absorbansi yang diperoleh yaitu pada rentang 0,2nm-0,8nm.

b. Pembuatan larutan blanko DPPH

Cara pembuatan larutan blanko dengan metode 1 mL etanol p.a kemudian masukan kedalam vial larutan dpph ditambahkan sebanyak 1 mL, ditambahkan sebanyak 2 mL etanol p.a kemudian kocok hingga homogen dan diamkan selama 30 menit. Selanjutnya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang 515 nm.

c. Pembuatan larutan stok ekstrak uji

Sampel ekstrak ini dibuat larutan induk dengan masing-masing konsentrasi yang berbeda-beda larutan dengan pelarut etanol p.a, lalu dibuat seri pengenceran. Absorbansi yang diperoleh yaitu 0,2-0,8 nm

d. Penentuan Panjang gelombang maksimum

Larutan DPPH dengan konsentrasi 100 mL dapat disimpan dengan wadah yang tertutup dari cahaya dengan lapisan alumunium foil. Setiap larutan DPPH perlu dibuat baru. Larutan ini dapat ditentukan dengan spektrum menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada Panjang gelombang 400-800 nm. Maksimum Panjang gelombangnya yaitu 515,5 nm.

e. Penentuan aktivitas antioksidan

2 mL sampel ditambahkan 2 mL larutan DPPH (1:1), inkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan. Ukur absorbansi pada gelombang maksimal 515-520 nm. Lakukan dengan perlakuan yang sama pada perbandingan vitamin C dengan sampel uji.

f. Perhitungan aktivitas antioksidan

Untuk mendapatkan nilai % aktivitas antioksidan dihitung dengan rumus:

$$(\%) = \frac{\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100 \%$$

Harga IC<sub>50</sub> yang diperoleh dari kurva regresi linier antara % inhibisi sarapan dengan konsentrasi. Bandingan dengan vitamin C untuk mengetahui kekuatan aktivitas antioksidan

g. Larutan stok pembanding vitamin C

Pada konsentrasi 500 ppm vitamin C sebanyak 10 mg dilakukan dengan 10 mL etanol p.a. kemudian dibuat seri konsentrasi larutan induk dengan 1;2;3;4 dan 5 mL.

### **5.9. Penentuan Kadar Fenol Total**

Penentuan kadar fenol total menggunakan reagen Folin-Ciocalteu. Pembuatan larutan induk dengan cara ekstrak dilarutkan menggunakan etanol air (1:1), saring dengan kertas whatman no 4 lalu tambahkan sampai tanda batas, ekstrak sampel sebanyak 0,5 mL ditambahkan dengan 5 mL folin-ciocalteu (sebelum diencerkan menggunakan air 1:10) diinkubasi selama 5 menit. Standar yang digunakan adalah asam galat. Ekstrak dan standar dapat diukur dengan Panjang gelombang 765 nm. Dari kurva kalibrasi yang di dapat kadar fenol total bisa dihitung sebagai asam galat (GAE mg) (Ghasemi et al., 2009).

### **5.10. Penetapan Kadar Flavonoid Total**

sampel dan standar dilakukan menggunakan metanol dan tambahan AICI<sub>3</sub> 25 dalam etanol 96% dengan perbandingan volume 1:1 kemudian di inkubasi selama 1 jam, absorbansi diukur dengan Panjang gelombang 420 nm dengan perbandingan kuersetin yang rentang konsentrasinya 8-20 mL dalam etanol (Ordon dkk., 2006).