

## BAB III TATA KERJA

### 3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, Panci dekok, Timbangan analitik (*Henher*), Penangas air, Erlenmeyer (*Pyrex*), Gelas *beaker* (*Pyrex*), Gelas ukur (*Pyrex*), Corong pemisah (*Pyrex*), Tabung reaksi (*Pyrex*), Rak tabung reaksi, Batang pengaduk, Sonde oral, *Spuite* 6 mL, Corong, Oven (*Argowindo*), Tanur (*Branstead Thermolyne*), *Desintegration tester* (*Mammert*), *Thickness Gauge* (*Teclock*), Instron, pH meter (HANNA HI 8424), Viskometer (*Brookfield*), Mortir, Stamper, Loyang, *Hotplate* (*Thermolyne Chimarec*), Kulkas (*Sharp*).

### 3.2 Bahan

#### 3.2.1 Bahan Uji

Bahan yang digunakan diantaranya tumbuhan segar rimpang jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) yang diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko di Kecamatan Lembang Kabupaten Bandung Barat dan air perasan jeruk lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.f.) yang diperoleh dari PT. Agro Jabar.

#### 3.2.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah : *aquadestilata*, etanol 96% dan bahan-bahan untuk penapisan fitokimia seperti ammonia, asam klorida 2N, kloroform, serbuk magnesium, asam sulfat pekat, asam asetat anhidrat, asam klorida 0,1N, besi (III) klorida, serbuk Mg, larutan gelatin 1%, amil alkohol, eter, dan KOH. Pereaksi yang digunakan adalah pereaksi *Dragendorff*, *Mayer*, *Lieberman-Burchard*, dan pereaksi vanilin sulfat. Pada pembuatan *edible film* digunakan HPMC, kitosan, sorbitol, dan pemanis *stevia*. Bahan pembanding yaitu *Orlistat* (*Vistat*).

#### 3.2.3 Bahan Pakan

MDLT (Makanan Diet Lemak Tinggi) sebagai bahan penginduksi diantaranya dapat dilihat di tabel 3.1.

Tabel 3.1. Makanan Diet Tinggi Lemak (Alemina, 2017)

| Bahan Pakam                   | Persentase Pakan (%) |
|-------------------------------|----------------------|
| Kuning Telur                  | 15                   |
| Lemak Sapi                    | 10                   |
| Margarin ( <i>Blue Band</i> ) | 10                   |
| Minyak Goreng                 | 5                    |
| Nasi Putih                    | 30                   |
| Pokphan 551                   | 25                   |
| Tepung Terigu                 | 5                    |

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *Pretest-Posttest Control Group Design* (Pocock, 2008). Objek yang diamati dari penelitian eksperimental ini mengenai pemberian kombinasi ekstrak kering jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) dan jeruk lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.f.) terhadap kadar lemak pada hewan uji tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.). Obesitas pada tikus ditentukan berdasarkan indeks obesitas  $Lee > 0,3$ . Indeks obesitas *Lee* dapat dilihat pada persamaan 2.1 rumus indeks *Lee*.

#### 3.3.2. Pengumpulan Bahan Baku dan Determinasi Tanaman

Bahan penelitian berupa rimpang jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) dan jeruk lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.f.) diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko di Kecamatan Lembang Kabupaten Bandung Barat dan PT. Agro Jabar. Determinasi tanaman dilakukan di Sekolah Ilmu Dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung.

#### 3.3.3. Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi simplisia dilakukan untuk mengetahui mutu dan kualitas simplisia dengan membandingkan hasil yang di dapatkan dengan data dari literatur.

Pengujian karakterisasi simplisia meliputi :

##### A. Penetapan Kadar Abu

Lebih kurang 2 sampai 3 gram simplisia yang telah digiling dan ditimbang seksama, kemudian dimasukkan ke dalam cawan krus silikat yang telah dipijar dan ditara. Perlahan-lahan dilakukan pemijaran sampai arang habis, kemudian di dinginkan dan ditimbang (Depkes RI, 2010).

##### B. Penetapan Kadar Sari Larut Air

Serbuk simplisia terlebih dahulu dikeringkan kemudian sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan menggunakan 100 mL air, 10 mL kloroform P, dalam botol sambil dilakukan pengocokan berkali-kali selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Dilakukan penyaringan dan diuapkan 20 mL filtrat diuapkan pada suhu 105°C hingga kering dalam cawan yang telah ditara. Kadar sari larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2010).

Perhitungan :

% Kadar Sari Larut Air:

$$\frac{(\text{bobot cawan} + \text{residu}) - \text{bobot cawan kosong} \times 100\%}{\text{bobot ekstrak awal}}$$

#### C. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Serbuk simplisia terlebih dahulu dikeringkan kemudian lebih kurang 5 gram serbuk simplisia ditimbang dan dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 96% di dalam labu bersumbat dan dilakukan pengocokan berkali-kali selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan selama 18 jam. Dilakukan penyaringan dengan cepat untuk menghindari penguapan etanol. Dari hasil penyaringan, filtrat diuapkan sebanyak 20 mL sampai kering dalam cawan penguap yang telah dipanaskan dengan suhu 105°C dan ditara hingga bobot tetap. Kadar sari larut etanol 96% dihitung dalam % (Depkes RI, 2010).

Perhitungan kadar sari larut etanol (%):

$$\frac{(\text{bobot cawan} + \text{residu}) - \text{bobot cawan kosong} \times 100\%}{\text{bobot ekstrak awal}}$$

#### 3.3.4. Ekstraksi Metode Dekoktasi

Tumbuhan rimpang jahe segar di ekstraksi dengan metode dekoktasi yaitu dengan merebus tumbuhan bersama pelarut air yang di panaskan dengan menggunakan titik didih air (90°C-100°C). Sebanyak 1 kg jahe segar diekstraksi dengan 1 L air (1:1) di dalam panci infus selama 30 menit. Saring panas-panas menggunakan kain flanel (Febriani dkk, 2017). Pada pembuatan ekstrak jeruk lemon hanya diambil air perasan jeruk lemon dan tidak menggunakan perebusan ataupun metode ekstraksi lain. Jeruk lemon yang digunakan sebanyak ± 2 kg untuk diambil air perasannya sebanyak 1 L. Air rebusan jahe dan jeruk lemon diserbukkan dengan menggunakan *freeze dryer*. Bobot serbuk ditimbang dan

kemudian ditentukan nilai rendemen (% b/b) terhadap bobot awal simplisia (Febriani dkk, 2017).

### 3.3.5. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia terhadap tumbuhan dan ekstrak kering rimpang jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) dan jeruk lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.f.) dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam rimpang jahe dan jeruk lemon ini. Secara umum pemeriksaan ini meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, polifenol, triterpenoid, steroid, kuinon, saponin, monoterpen, dan seskuiterpen. Adapun langkah kerjanya adalah sebagai berikut:

#### A. Alkaloida

Sampel dibasakan dengan larutan ammonia 10%, ditambahkan kloroform, kemudian dikocok. Lapisan kloroform dipipet dan ditambahkan larutan asam klorida 2 N. Campuran dikocok kuat hingga terdapat dua lapisan. Lapisan asam (lapisan atas) dipipet, kemudian dibagi menjadi tiga bagian.

Bagian 1 : tambahkan pereaksi *Mayer*, bila terjadi kekeruhan atau endapan berwarna putih, berarti pada simplisia rimpang jahe dan jeruk lemon terkandung alkaloid.

Bagian 2 : tambahkan pereaksi *Dragendorff*, bila terjadi kekeruhan dan endapan berwarna jingga coklat, berarti terdapat alkaloid.

Bagian 3 : digunakan sebagai pembanding (Tiwari, *et al.*, 2011).

#### B. Flavonoid

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan serbuk magnesium dan asam klorida 2 N, kemudian dipanaskan ditangas air selama 30 menit, kemudian ditambahkan amil alkohol, dikocok kuat-kuat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah dalam lapisan amil alkohol (Tiwari, *et al.*, 2011).

#### C. Polifenol

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan sedikit air dan dipanaskan. Larutan pereaksi besi (III) klorida ditambahkan. Adanya senyawa polifenol ditandai dengan terjadinya warna biru hitam (Tiwari, *et al.*, 2011).

#### D. Tanin

Sebanyak 1 gram sampel ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan gelatin. Hasil positif menunjukkan terbentuknya endapan putih (Tiwari, *et al.*, 2011).

E. Monoterpen dan Seskuiterpen

Sampel digerus dengan eter, kemudian ambil lapisan eter dan ditempatkan ke dalam cawan penguap. Dibiarkan hingga semua eternya menguap. Ke dalam hasil penguapan ditambahkan larutan vanilin 10% dalam asam sulfat pekat. Terjadinya perubahan warna-warna menunjukkan adanya monoterpen dan seskuiterpen (Tiwari, *et al.*, 2011).

F. Kuinon

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dipanaskan di atas penangas air, lalu ditambahkan larutan KOH 5%. Adanya senyawa kuinon ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning hingga merah (Tiwari, *et al.*, 2011).

G. Saponin

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan air dan dipanaskan beberapa saat. Setelah dingin, dikocok kuat-kuat selama kurang lebih 30 detik. Pembentukan busa sekurang-kurangnya setinggi 1 cm dan persisten (tetap) selama beberapa menit serta tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida encer. Pembentukan busa ini menunjukkan bahwa adanya saponin pada simplisia (Tiwari, *et al.*, 2011).

H. Steroid dan Triterpenoid

Sampel ditambahkan dengan eter dan digerus, kemudian diambil lapisan eter, lalu ditempatkan di cawan penguap, dan eternya dibiarkan menguap, ke dalam hasil pengeringan ditambahkan pereaksi *Lieberman Burchard*. Terbentuknya warna ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid dan warna biru menunjukkan adanya senyawa steroid (Tiwari, *et al.*, 2011).

3.3.6. Tahapan Uji Aktivitas Antiobesitas dari Kombinasi Ekstrak Kering Rimpang Jahe dan Jeruk Lemon

A. Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah hewan tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar dengan bobot 150-250 gram yang diperoleh dari peternakan tikus di Cimahi Jawa Barat sebanyak 25 ekor. Hewan uji di aklimatisasi dalam kandang selama 7 hari di lingkungan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia dan di makan dengan menggunakan pakan standar dan air minum secukupnya. Tikus diinduksi MDLT (makanan diet lemak tinggi) dan ditimbang yaitu selama 8 minggu. Tikus dinyatakan obesitas jika indeks *Lee* yaitu  $\geq 0,3$ .

B. Pembuatan Bahan Perbandingan

Kapsul Orlistat 120 mg sebanyak 5 kapsul di timbang. Serbuk Orlistat kemudian di gerus dalam mortir lalu ditimbang dengan dosis yang sudah di konversikan. Di larutkan 47,52 mg dengan akuades sebanyak 12 mL.

C. Formula Sediaan *Edible Film*

Tabel 3.2. Pembuatan Sediaan *Edible film* Ekstrak Jahe dan Lemon (Santosa, 2018)

| Bahan                | Formula (dalam gram) |
|----------------------|----------------------|
| Ekstrak kering jahe  | 1,8                  |
| Ekstrak kering lemon | 1,8                  |
| HPMC                 | 6,31                 |
| Kitosan              | 3,16                 |
| Sorbitol             | 12,62                |
| <i>Stevia</i>        | q.s                  |
| <i>Aquadest</i>      | Ad 200 mL            |

D. Pembuatan *Edible Film* Ekstrak Kering Jahe dan Lemon

Di dalam mortir yang berisi akuades panas ditaburkan HPMC dan kitosan, kemudian aduk hingga larut dan ditambahkan sorbitol, kemudian diaduk hingga homogen. Dimasukkan ekstrak kering jahe dan lemon dan aduk hingga homogen. Pemanis *stevia* ditambahkan secukupnya dan diaduk hingga homogen. Setelah itu didapat massa *edible film* dan dilakukan pengujian pH, dan viskositas. Massa yang telah didapat dituang ke dalam loyang berukuran 28 x 28 cm kemudian dikeringkan dengan kulkas pada suhu 15°C selama 5 hari. Dilakukan evaluasi sediaan *edible film* (Santosa, 2018).

E. Uji Aktivitas Antiobesitas dari Kombinasi Ekstrak Kering Rimpang Jahe dan Jeruk Lemon

Tikus putih jantan sebanyak 25 ekor dibagi menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok berjumlah 5 ekor tikus. Pembagian kelompok tikus terdiri dari :

1. Kontrol normal : diberikan pakan standar
2. Kontrol negatif : diberikan induksi MDLT
3. Kontrol positif : diberikan MDLT dan orlistat
4. Kelompok uji : diberikan ekstrak kombinasi jahe dan kombinasi ekstrak jeruk lemon dengan dosis 40 mg
5. Kelompok uji : diberikan sediaan *edible film* dengan sediaan *edible film* dosis 40 mg yang telah dilarutkan.

Masing-masing kelompok diberikan perlakuan secara oral selama 3 minggu, lalu dilakukan penimbangan berat badan tikus setiap 3 hari sekali. Untuk melihat tikus sudah mengalami obesitas dihitung dengan cara indeks *Lee*. Tikus dinyatakan obesitas jika indeks obesitas *Lee* > 0,3. Data penurunan berat badan yang diperoleh dirata-ratakan dan dihitung persentase penurunannya (Gabriela dkk, 2013).

### 3.3.7. Evaluasi Fisik Sediaan *Edible Film* Ekstrak Kering Rimpang Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) dan Jeruk Lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.f.)

#### A. Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis meliputi pengamatan bentuk, warna, bau, dan rasa dari *edible film* yang dihasilkan. Pemeriksaan dilakukan pada suhu kamar (15-30°C) (Harmeliy, dkk.,2014).

#### B. pH

Pemeriksaan ini dilakukan dengan menggunakan alat pH meter. Alat ini terlebih dahulu dikalibrasi menggunakan dapar pH 4, pH 7, dan pH 9. Elektroda dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Pengukuran pH *edible film* dilakukan dengan cara 1 gram *edible film* dilarutkan dengan akuades hingga 10 mL. Elektroda dicelupkan dalam wadah tersebut, angka menunjukkan pada pH merupakan nilai pH *edible film* (Harmeliy, dkk.,2014).

#### C. Viskositas

Massa *edible film* disiapkan dan dimasukkan ke dalam *beakerglass* kemudian diberi *stirrer magnetic. Spindle* dipasang sesuai pada viskometer kemudian celupkan pada larutan dan nyalakan. Tiap data yang diperoleh pada layar tentang No. *Spindle*, RPM, CPS dan prosentase dicatat. Viskositas larutan dilihat dari CPN pada persentase tertinggi (Santosa, 2018).

D. Keseragaman Ukuran

Uji ukuran untuk *edible film* belum ditentukan mengenai standarnya, maka yang menjadi acuan sebagai standar adalah sediaan yang telah beredar di pasaran. Ukuran yang beredar di pasaran 3,5 cm x 2,5 cm, sehingga pemotongan *edible film* disesuaikan dengan ukuran yang berada di pasaran. Uji ketebalan *film* pada penelitian ini dilakukan dengan pengukuran secara acak pada tiga titik yang berbeda pada *edible film* dengan menggunakan *thickness gauge*. Lalu dijumlahkan dan dicari ketebalan rata-ratanya.

E. Uji Kekuatan Tarik (*Tensile Strength*)

Kekuatan tarik dan kemuluran dari film diuji dengan alat Instron. *Edible film* dipotong dengan ukuran 6 cm x 1 cm. Luasan *edible film* yang dijepit adalah 2 cm (di kedua sisi panjangnya). *Load cell* atau beban yang digunakan adalah 2000 gram. Nilai kekuatan tarik dibaca setelah sampel ditarik (Bourtoom, 2008).

F. Uji *Elongasi* (Persentase Pemanjangan)

Persen pemanjangan dari *edible film* diuji menggunakan alat Instron. *Edible film* dipotong dengan ukuran 6 cm x 1 cm. Luasan *edible film* yang dijepit adalah 2 cm (dikedua sisi panjangnya). *Load cell* atau beban yang digunakan adalah 2000 gram. Nilai kekuatan tarik dibaca setelah sampel ditarik (Bourtoom, 2008).

$$\text{Kemuluran} = \frac{\text{yang terbaca}}{\text{jarak jepit}} \times 100\%$$

G. Uji Waktu Hancur

Waktu hancur *edible film* sesuai dengan uji waktu hancur tablet menggunakan alat *disintegrator tester* dengan media akuades bersuhu  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  dengan persyaratan sediaan dapat memberikan waktu hancur minimal dalam waktu 5-30 menit (Sontek dkk., 2014).



### 3.3.8. Analisis Statistik

Data kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok uji. Analisis statistik menggunakan *Analysis of variance* (ANOVA), kemudian di uji lanjut menggunakan *Least Significant Difference* (LSD). Adanya perbedaan bermakna jika nilai  $p < 0,05$ .