

## **BAB III**

### **TATA KERJA**

#### **3.1. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca *analitik* (Hanherr dan Sartorius), *rotary evaporator* RV10 (IKA), spatel, penggiling (Hammer mill<sup>®</sup>), stamper, mortir, spirtus, kaki tiga, alat-alat gelas (Pirex) yang biasa digunakan dalam laboratorium, cawan penguap, pipet tetes, kandang tikus, plat KLT, *chamber*, sarung tangan (Sensi<sup>®</sup>), sonde oral, spuit, dan sinar UV.

#### **3.2. Bahan**

Bahan tanaman yang digunakan adalah biji kabau (*Archidendron bubalinum*) yang diperoleh dari Kampung Bumi Baru, Kecamatan Blambangan Umpu, Desa Gunung Sari, Kabupaten Way Kanan, Lampung Utara. Pelarut untuk ekstraksi etanol 96%, n-heksan, dan etil asetat. Bahan kimia yang digunakan diantaranya: pereaksi Mayer (HgCl<sub>2</sub>, KI dan Aquadest), pereaksi Dragendroff (Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O, HNO<sub>3</sub>, KI dan Aquadest), larutan FeCl<sub>3</sub>, larutan gelatin 1%, serbuk Mg, amil alkohol, eter, toluene, pereaksi *Lieberman-Burchard* (Asam asetat anhidrat, Kloroform dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), vanilin-asam sulfat, kalium hidroksida, AlCl<sub>3</sub>, DPPH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, glibenklamid, glukosa, Na CMC 1% dan aquades. Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *Wistar* dengan bobot badan 150-250 gram yang diperoleh dari perternakan Cimahi.

#### **3.3. Metode Penelitian**

##### **3.3.1. Pengumpulan Bahan**

Bahan penelitian berupa biji kabau yang diperoleh dari Kampung Bumi Baru, Kecamatan Blambangan Umpu, Desa Gunung Sari, Kabupaten Way Kanan, Lampung Utara.

##### **3.3.2. Determinasi Tanaman**

Determinasi tanaman yang dilakukan di Pusat Penelitian Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor.

### 3.3.3. Pengolahan Bahan

Biji kabau dikumpulkan, disortasi, dicuci, dikeringkan pada suhu ruangan 25-30°C, terlindung dari cahaya matahari secara langsung dan diblender.

### 3.3.4. Karakterisasi Simplisia

Pemeriksaan karakterisasi simplisia dilakukan meliputi penetapan kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar abu larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, susut pengeringan, dan kadar air (Kemenkes RI, 2013).

#### A. Penentuan Kadar Abu Total

Simplisia yang sudah ditimbang sebanyak 2 gram dan digerus halus, dimasukan ke dalam krus, kemudian dipijarkan hingga arangnya habis, didinginkan dan ditimbang. Kadar abu total dihitung terhadap simplisia yang sudah dikeringkan diudara (Kemenkes RI, 2013).

#### B. Penentuan Kadar Sari Larut Air

Diambil 5 gram simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan menggunakan 100 mL air klorofom pekat dalam labu tersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan biarkan selama 18 jam, kemudian disaring dan 20 mL filtrat diuapkan hingga kering, kemudian dihitung terhadap bobot bahan yang telah dikeringkan (Kemenkes RI, 2013).

#### C. Penentuan Kadar Sari Larut Etanol

Diambil 5 gram simplisia 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. Kemudian disaring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol. Kemudian 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam kering dalam cawan. Kadar sari yang larut dalam etanol 96% dihitung terhadap bobot yang sudah dikeringkan (Kemenkes RI, 2013).

D. Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi, yaitu dengan memasukan 5 gram simplisia, lalu ditambahkan sejumlah 100 mL toluen jenuh air kedalam labu yang telah berisi sampel uji lalu dididihkan samapi toluen mendidih, kemudian dilakukan penyulingan dengan kecepatan  $\pm 2$  tetes perdetik hingga sebagian besar air tersuling dan kemudian dinaikan 4 tetes perdetik. Penyulingan dihentikan setelah air telah tersuling, setelah air dan toluen pada tabung penerimaan memisah, maka dilakukan perhitungan kadar air dengan cara menghitung volume air terhadap bobot kering simplisia (Kemenkes RI, 2013).

E. Susut Pengerinan

Simplisia ditimbang 5 gram dalam cawan penguap yang sebelumnya telah dipanaskan dan ditara. Bahan diratakan dalam cawan penguap, lalu dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu 105°C selama 6 jam, setelah itu biarkan cawan penguap mendingin dalam eksikator hingga suhu ruangan (Kemenkes RI, 2013).

F. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Dididihkan abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit. Kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, disaring menggunakan kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan dalam cawan krus hingga bobot tetap (Kemenkes RI, 2013).

G. Kadar Abu Larut Asam

Dididihkan abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit. Kumpulkan bagian yang larut dalam asam, disaring menggunakan kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan dalam cawan krus hingga bobot tetap (Kemenkes RI, 2013).

### 3.3.5. Ekstraksi

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 1349,32 gram, kemudian diekstraksi dengan cara ekstraksi kepolaran bertingkat dengan metode soxhletasi. Pelarut yang digunakan adalah pelarut dengan kepolaran makin meningkat yaitu n-heksan, etil asetat, dan etanol 96%, masing-masing pelarut yang digunakan 4,5 liter. Serbuk simplisia dibungkus dengan kertas saring, kemudian diekstraksi dengan pelarut n-heksan 4,5 liter sampai pelarut berwarna bening dengan suhu 40-50°C. Hasil filtrat yang diperoleh dikentalkan menggunakan *Rotary evaporator* pada suhu 50°C. Ampas dikeluarkan dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Ampas yang telah dikeringkan selanjutnya diekstraksi dengan pelarut etil asetat 4,5 liter sampai pelarut berwarna bening dengan suhu 40-50°C. Hasil filtrat yang diperoleh dikentalkan menggunakan *Rotary evaporator* pada suhu 50°C. Ampas dikeluarkan dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Ampas yang telah dikeringkan selanjutnya diekstraksi dengan pelarut etanol 96% 4,5 liter sampai pelarut berwarna bening dengan suhu 40-50°C. Hasil filtrat yang diperoleh dikentalkan menggunakan *Rotary evaporator* pada suhu 50°C. Selanjutnya dalam cawan penguap, ekstrak diuapkan pada suhu kamar sehingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak ditimbang, kemudian ditentukan nilai rendemennya. Rendemen ekstrak ditetapkan dengan rumus :

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat Ekstrak Total}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100\%$$

(Novianti, 2016).

### 3.3.6. Skrining Fitokimia

Untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak kabau maka dilakukan skrining fitokimia sebagai berikut :

#### A. Alkaloid

Sampel dibasakan dengan ammonia, kemudian ditambahkan klorofom dan digerus kuat kuat. Lapisan klorofom diambil kemudian ditambahkan asam klorida 2N. setelah itu dikocok kuat-kuat dan terbentuk dua lapisan, lapisan asam diambil, dibagi menjadi tiga bagian.

Bagian 1 ditambahkan pereaksi Dragendrof. Jika ada kekeruhan atau endapan berwarna jingga-kuning, berarti kemungkinan mengandung alkaloid.

Bagian 2 ditambahkan pereaksi mayer. Jika terjadi kekeruhan atau endapan berwarna putih, menunjukkan sampel kemungkinan mengandung alkaloid (Fransworth, 1996).

B. Flavonoid

Sampel dalam tabung reaksi dicampur dengan Mg dan HCl 2N. Campuran dipanaskan dan disaring. Kepada filtrat ditambahkan amil alkohol, dikocok kuat-kuat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol (Fransworth, 1996).

C. Tanin

Sejumlah kecil serbuk simplisia atau ekstrak ditambahkan air panas, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan gelatin 1%, adanya senyawa tanin ditandai dengan timbul endapan putih (Fransworth, 1996).

D. Fenolat

Sampel ditambahkan air dalam tabung reaksi, kemudian dipanaskan dan disaring. Pada filtrat ditambahkan pereaksi  $FeCl_3$ , adanya fenolat ditandai dengan terbentuknya warna hijau-biru hitam hingga hitam (Fransworth, 1996).

E. Monoterpen dan Seskuiterpen

Sampel digerus dengan eter, filtranya diambil dan ditempatkan dalam cawan penguap, dan dibiarkan kering. Tambahkan larutan vanilin 10% dalam  $H_2SO_4$  pekat. Terjadinya warna-warna menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan seskuiterpen (Fransworth, 1996).

F. Steroid dan Triterpenoid

Sampel digerus dengan eter, filtratnya diambil dan ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan kering. Tambahkan pereaksi *Lieberman-Burchard*. Terbentuknya warna ungu menunjukkan adanya

senyawa triterpenoid sedangkan warna hijau biru menunjukkan adanya steroid (Fransworth, 1996).

G. Kuinon

Sampel ditambahkan air dalam tabung reaksi, lalu dipanaskan dan disaring. Pada filtrat ditambahkan KOH 5%. Adanya senyawa kuinon ditandai dengan terjadinya warna kuning (Fransworth, 1996).

H. Saponin

Sampel ditambahkan air, lalu dipanaskan disaring. Filtrat dimasukan dalam tabung reaksi, dikocok kuat-kuat. Terbentuknya busa yang mantap dan tidak hilang selama 10 menit dengan tinggi busa minimal 1 cm menunjukkan adanya saponin (Fransworth, 1996).

3.3.7. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kandungan golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak diidentifikasi dengan uji KLT menggunakan plat silika gel GF<sub>254</sub> sebagai fase diam dan fase gerak yang digunakan n-heksan : etil asetat : asam asetat (7 : 3 : 2 tetes), etil asetat : klorofom : asam asetat (7 : 3 : 2 tetes), dan metanol : etil asetat : asam format : air (2,5 : 5,5 : 1 : 1). Sampel ditotolkan pada silika gel. Setelah kering, plat KLT tersebut langsung dielusi dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan. Plat diangkat dan dikeringkan lalu diamati dilampu UV 254 dan 366. Penyemprot penampak bercak yang digunakan yaitu asam sulfat 10%, DPPH 5%, besi (III) klorida 5%, AlCl<sub>3</sub>, dan liberman burchard.

3.3.8. Uji Aktivitas Antidiabetes

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar dengan berat badan 150-250 gram. Tikus diadaptasikan di lingkungan Laboratorium Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia selama 7 hari dengan diberi makan dan minum secara terkontrol setiap hari. Semua tikus dipuaskan terlebih dahulu selama 18 jam. Kemudian tikus diukur kadar glukosa darah puasanya menggunakan glukosa *test*. Tiap kelompok tikus mendapatkan perlakuan sebagai berikut :

Kelompok I : Kontrol normal

Kelompok II : Kontrol negatif diberi Na CMC 0,5% peroral.

- Kelompok III : Kontrol positif diberi glibenklamid 0,45 mg/Kg BB tikus peroral.
- Kelompok IV : Diberi ekstrak n-heksan biji kabau (dosis 250 mg, 500 mg, 750 mg) peroral.
- Kelompok V : Diberi ekstrak etil asetat biji kabau (dosis 250 mg, 500 mg, 750 mg) peroral.
- Kelompok VI : Diberi ekstrak etanol 96% biji kabau (dosis 250 mg, 500 mg, 750 mg) peroral.

Setelah 15 menit pemberian perlakuan, masing-masing tikus diberi glukosa 6,3 g/kgBB secara oral. Pada masing-masing kelompok diukur kembali kadar glukosa darah setiap 30, 60, 90, 120, dan 150 menit (Ningsih, 2014). Kadar glukosa darah dihitung dengan rumus kadar glukosa darah relatif (Cr), yaitu :

$$Cr = \frac{Ct}{Co} \times 100\%$$

Keterangan :

Ct = Kadar glukosa darah pada waktu t

Co = Kadar glukosa darah awal (t-0)

Sedangkan persentase penurunan (%P) kadar glukosa darah relatif dihitung dengan rumus :

$$\%P = \frac{Cr(-) - Cr(p)}{Cr(-)} \times 100\%$$

Keterangan :

Cr (p) = Kadar glukosa darah relatif kelompok uji

Cr (-) = Kadar glukosa darah relatif kelompok negatif

Data dianalisis menggunakan metode ANOVA (*Analysis of Varian*), kemudian dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Different Test/Uji Beda Nyata Terkecil*) (Yanti, 2013).