

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengkarakterisasi simplisia herba sambiloto. Tahap-tahap yang dilakukan yaitu karakterisasi simplisia dengan menggunakan parameter standar nonspesifik berupa uji fitokimia, penentuan kadar air, penentuan kadar abu, dan uji cemaran mikroba; ekstraksi simplisia herba sambiloto; penentuan aktivitas antioksidan; dan uji FTIR. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Pangan Pusat Penelitian Kimia LIPI Bandung, Laboratorium Riset Kimia Hayati dan Material, dan di Laboratorium Kimia Analitik Instrumen FPMIPA UPI. Penelitian ini dilakukan dari Desember 2014 sampai dengan Juli 2015.

B. Alat dan Bahan

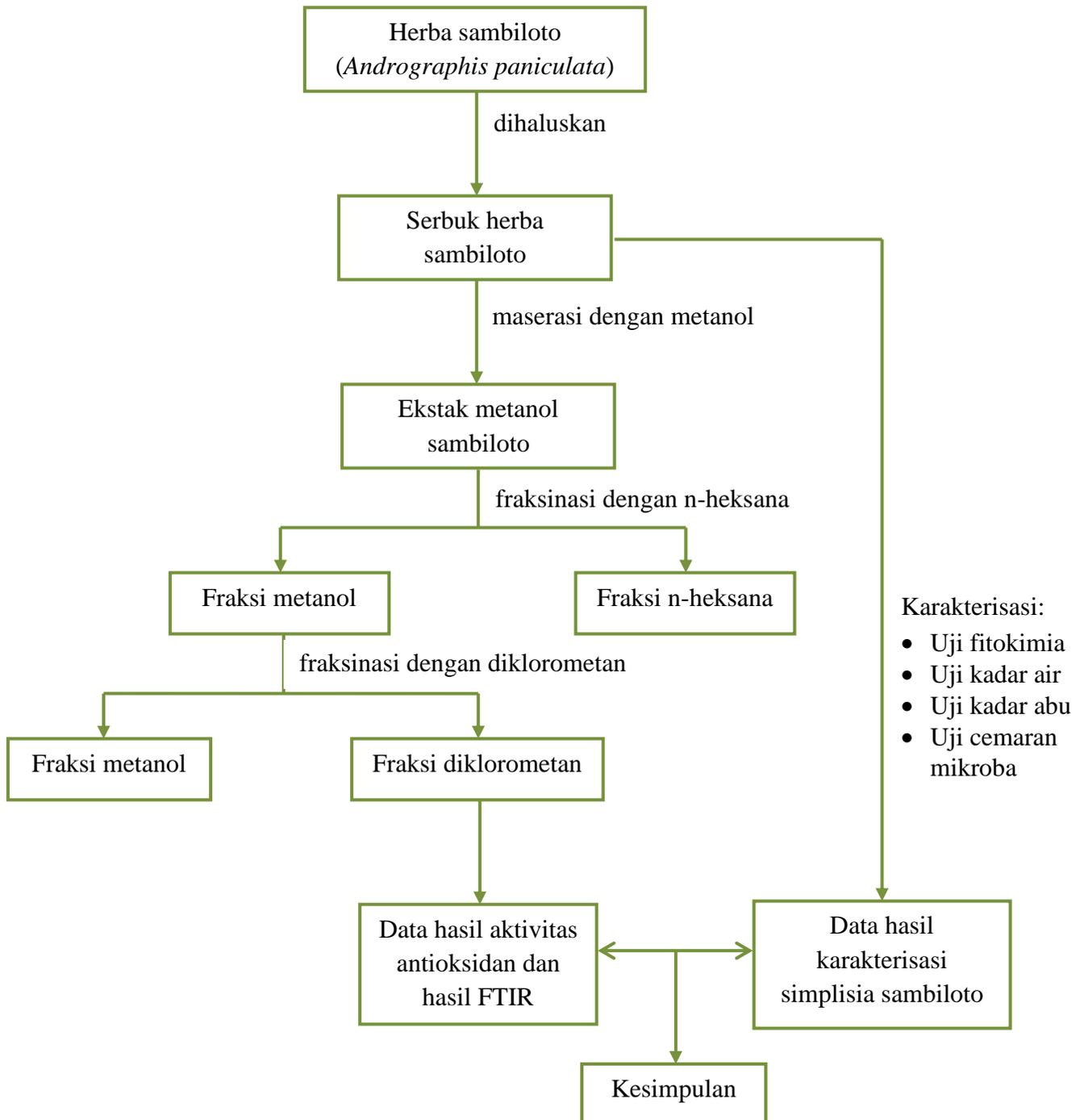
1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain gelas kimia, labu erlenmeyer, corong, labu evaporator, corong pisah, gelas ukur, pipet tetes, batang pengaduk, spatula, pinset, pipa kapiler, botol vial, statif dan klem, lemari es, oven, furnace, neraca analitik, *rotary evaporator*, spektrofotometer UV-VIS, FTIR SHIMADZU 8400.

2. Bahan

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) yang diperoleh dari toko jamu di salah satu pasar tradisional di Bandung. Bahan lain yang mendukung penelitian ini antara lain pelarut organik seperti metanol, n-Heksana, diklorometan, aquades, kertas saring, alumunium foil, media Nutrien Agar, media Potato Dextrosa Agar, DPPH.

C. Prosedur Penelitian



Gambar 3.1. Bagan alir karakterisasi simplisia sambiloto

1. Karakterisasi Simplisia Herba Sambiloto

a. Penetapan Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan dengan cara simplisia ditimbang sekitar 2 gram dalam botol tertutup, kemudian dipanaskan dalam oven yang bersuhu 250°C selama 2 jam. Setelah dipanaskan, botol berisi simplisia tersebut dimasukkan ke dalam desikator. Setelah dingin, timbang berat botol berisi simplisia tersebut sampai bobotnya stabil.

$$\% \text{ kadar air} = \frac{W_1}{W_0} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 = massa simplisia awal (gram)

W_1 = selisih massa botol + simplisia sebelum pemanasan dan setelah pemanasan

b. Penentuan Kadar Abu

Simplisia uji yang ditimbang sebanyak 3 gram, dimasukkan ke dalam cawan krus silikat yang sebelumnya telah dipijarkan dan ditimbang (W_0). Setelah itu simplisia dipijarkan dengan menggunakan tanur secara perlahan-lahan dengan suhu dinaikkan secara bertahap hingga $600 \pm 25^\circ\text{C}$ (Arifin, H., Anggraini, Handayani, dan Rasyid, 2006) hingga arang habis. Kemudian ditimbang beratnya sampai konstan (W_2).

$$\% \text{ kadar abu total} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 = massa cawan kosong (gram)

W_1 = massa simplisia awal (gram)

W_2 = massa cawan + simplisia setelah diabukan (gram)

c. Uji Cemarkan Mikroba

Pada penyiapan sampel ditimbang 1 gram simplisia. Sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, lalu ditambahkan aquades sampai 10 mL sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} ,

dan dikocok hingga larut atau dengan bantuan vortex. Dilanjutkan dengan pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} (Depkes RI, 2000).

1) **Angka Lempengan Total (ALT)**

Dipipet 1 mL dari tiap pengenceran ke dalam cawan petri yang steril (duplo), dengan menggunakan pipet yang berbeda dan steril untuk tiap pengenceran. Ke dalam tiap cawan petri dituangkan 5 mL media Nutrient Agar yang telah dicairkan bersuhu kurang lebih 45°C . Cawan petri digoyangkan dengan hati-hati hingga sampel bercampur rata dengan pembedihan. Kemudian dibiarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku. Cawan petri dengan posisi terbalik dimasukkan ke dalam lemari inkubator suhu 35°C selama 24 jam. Catat pertumbuhan koloni pada masing-masing cawan yang mengandung 30 – 300 koloni setelah 24 jam. Hitung ALT dalam koloni/g sampel dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang sesuai (Depkes RI, 2000).

2) **Kapang dan Khamir**

Ke dalam cawan petri yang steril (duplo) tuangkan 5 mL media Potato Dextros Agar yang telah dicairkan bersuhu 45°C , biarkan membeku pada cawan. Pipet 0,5 mL dari tiap pengenceran ke dalam cawan petri yang steril (metode semai), dengan menggunakan pipet yang berbeda dan steril untuk tiap pengenceran. Cawan petri digoyangkan dengan hati-hati hingga sampel tersemai secara merata pada media. Kemudian diinkubasikan ke dalam lemari inkubator dengan suhu 35°C selama 24 jam. Dicatat hasil sebagai jumlah kapang dan khamir/g sampel (Depkes RI, 2000).

d. Uji Fitokimia**1) Alkaloid**

Sejumlah sampel dilarutkan dalam beberapa tetes asam sulfat 2 N, kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi Wagner. Hasil uji dinyatakan positif bila membentuk endapan coklat (Mojab *et al.*, 2003).

2) Flavonoid

Sejumlah sampel ditambahkan serbuk magnesium 0,1 mg dan 0,4 mL amil alkohol (campuran asam klorida 37% dan etanol 95% dengan volume yang sama) dan 4 mL alkohol 70%, kemudian campuran dikocok. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harborne, 1987).

3) Saponin

Sebanyak 1 mL ekstrak herba sambiloto (*A. paniculata*) dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2 mL aquades, lalu dikocok sampai homogen. Setelah itu, dipanaskan selama 2 – 3 menit. Dinginkan, setelah dingin kocok dengan kuat. Adanya busa yang stabil selama 30 detik menunjukkan sampel mengandung saponin (Harborne, 1987).

4) Steroid/Terpenoid

Sebanyak 1 mL herba sambiloto (*A. paniculata*) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat. Jika terbentuk warna biru atau hijau menandakan adanya steroid. Jika terbentuk warna ungu atau jingga menandakan adanya triterpenoid (Harborne, 1987).

5) **Tanin**

Sebanyak 1 mL herba sambiloto (*A. paniculata*) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan FeCl_3 sebanyak 3 tetes. Jika menghasilkan biru karakteristik, biru-hitam, hijau atau biru-hijau dan endapan positif mengandung tanin (Mojab *et al.*, 2003).

2. **Ekstraksi Herba Sambiloto**

Serbuk herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) sebanyak 100 g diekstraksi menggunakan pelarut metanol. Teknik ekstraksi yang digunakan yaitu ekstraksi padat-cair dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut metanol sebanyak 1 L selama 1x24 jam. Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring menggunakan corong Buchner lalu dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Ekstrak metanol hasil evaporasi kemudian dilarutkan kembali dengan metanol dan difraksinasi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksan dan diklorometan sehingga diperoleh fraksi *n*-heksan, fraksi diklorometan, dan fraksi metanol sisa. Ekstrak dari fraksi diklorometan kemudian dipekatkan dengan cara penguapan menggunakan alat *vacuum rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat fraksi diklorometan.

3. **Penentuan Aktivitas Antioksidan**

Pada tahap ini dilakukan uji aktivitas antioksidan terhadap ekstrak metanol pada fraksi diklorometan herba sambiloto. Pengujian aktivitas antioksidan ini dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (Hatano *et al.*, 1988). Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode ini berdasarkan pada DPPH *free radical scavenging activity*. Sebelumnya, larutan DPPH 0,5 mM dibuat terlebih dahulu dengan cara menimbang 4,9 mg DPPH dan melarutkannya dengan metanol dalam labu ukur 25 mL. Selain itu, dibuat pula larutan sampel, larutan blanko, dan larutan kontrol. Larutan sampel terdiri dari 0,5 mL sampel, 3 mL metanol, dan 0,3 mL DPPH 0,5 mM. Larutan blanko terdiri dari 0,5 mL sampel dan 3,3 mL metanol. Sedangkan larutan

kontrol terdiri dari 3,5 mL metanol dan 0,3 mL DPPH 0,5 mM. Ketiga larutan tersebut diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Visibel pada panjang gelombang 517 nm. Aktivitas antioksidan dihitung dalam % penghambatan, dan dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ penghambatan} = 100 - \left(\frac{\text{Absorbansi sampel} - \text{absorbansi blanko}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100$$