

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta selama 3 bulan.

C. Objek Penelitian

Objek pada penelitian ini yaitu biji *Curcubita moschata* Durch dari buah *C.moschata* tua.

D. Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *rotary evaporator*, labu bersumbat, cawan dangkal berdasar rata, Kromatografi Lapis Tipis (KLT), plat KLT GF₂₅₄, tabung reaksi, plat tetes, piknometer, botol timbang, labu, krus platina atau krus silikat, kertas saring, eksikator, timbangan analitik, oven.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu biji *Curcubita moschata* Durch, etanol 70%, etanol 95%, kloroform P, pelarut heksan, etil asetat, air, metanol, pereaksi Dragendorf, asam sulfat, eter, asam asetat anhidrat.

E. Tahapan Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Labu kuning yang digunakan dalam penelitian ini adalah labu kuning yang diperoleh dari Salatiga, Jawa Tengah. Bagian yang

digunakan adalah biji. Determinasi dilakukan dengan mengamati morfologi bagian-bagian tanaman labu kuning dan dibandingkan dengan pustaka. Determinasi akan dilakukan oleh lembaga khusus yang menangani analisis taksonomi tumbuhan.

2. Pembuatan ekstrak

Biji *Cucurbita moschata* Durch dibersihkan, dikeringkan, disortasi, dan diblender halus. Serbuk biji labu kuning kemudian di ambil sebanyak 2000 gram , dimaserasi dengan etanol 70% selama 6 hari sambil sekali-sekali diaduk. Maserat dikumpulkan lalu diuapkan dan dikentalkan dengan *rotary evaporator* sampai berat konstan.

3. Parameter Spesifik

- a. Penetapan identitas ekstrak, meliputi deskripsi tata nama (nama ekstrak, nama latin tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan, nama tumbuhan Indonesia) dan dapat mempunyai senyawa identitas. Tujuannya untuk memberikan identitas objektif dari nama dan spesifik dari senyawa identitas (Depkes, 2000).
- b. Penetapan organoleptik ekstrak, meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa (Depkes, 2000).
- c. Penetapan kadar senyawa terlarut dalam pelarut tertentu

1) Kadar senyawa yang larut dalam air

Sebanyak 5 g serbuk dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml kloroform P, menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18

jam. Kemudian disaring dan diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, sisa dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kemudian dihitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air, terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes, 2000).

2) Kadar senyawa yang larut dalam etanol

Sebanyak 5 g serbuk dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol (95%) menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol (95%), kemudian 20 ml filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara. Sisa dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kemudian dihitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol (95%) terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes, 2000).

d. Pola Kromatogram (Kromatografi Lapis Tipis)

Ekstrak 5 g di fraksinasi berturut-turut dengan pelarut heksan, etil asetat, etanol, air (10 ml setiap perlakuan). Fraksinasi dilakukan dengan pengocokan selama 15 menit (Depkes, 2000).

1) Uji Alkaloid

Fase gerak etilasetat – metanol – air (100:13,5:10) dimasukkan dalam chamber, dibiarkan sampai jenuh. Pada plat KLT GF₂₅₄ p ditotolkan kira-kira 5 μl masing-masing sari etil asetat, air,

kemudian dimasukkan ke dalam chamber, dielusi sampai tanda, diambil dan dibiarkan sampai kering. Ekstrak mengandung alkaloid bebas bila dilihat dibawah sinar UV 365 nm berfluoresensi hijau / berwarna jingga dengan pereaksi Dragendorf (Sthahl (1969), Hendrajaya dan Kesuma (2003) cit Arifin *et al.* (2006)).

2) Uji Terpenoid

Fase gerak dibuat campuran heksan-etilasetat (1:1) dimasukkan ke dalam chamber dan dibiarkan sampai jenuh. Pada plat KLT GF₂₅₄ p ditotolkan kira-kira 5 µl sari heksan dan dimasukkan pada chamber, dielusi sampai tanda, diambil dan dibiarkan sampai kering. Ekstrak mengandung terpenoid bebas bila dilihat dibawah sinar UV 365 nm berfluoresensi hijau / berwarna merah ungu atau biru dengan pereaksi asam sulfat pekat 10 % dalam metanol (Sthahl (1969), Hendrajaya dan Kesuma (2003) cit Arifin *et al.* (2006)).

e. Uji Kandungan Kimia Ekstrak

1) Uji Alkaloid

Fase gerak etilasetat – metanol – air (100:13,5:10) dimasukkan dalam chamber, dibiarkan sampai jenuh. Pada plat KLT GF₂₅₄ p ditotolkan kira-kira 5 µl masing-masing sari etilasetat, air, kemudian dimasukkan ke dalam chamber, dielusi sampai tanda, diambil dan dibiarkan sampai kering. Ekstrak mengandung alkaloid bebas bila dilihat dibawah sinar UV 365

nm berfluoresensi hijau / berwarna jingga dengan pereaksi Dragendorf (Sthahl (1969), Hendrajaya dan Kesuma (2003) cit Arifin *et al.* (2006)).

2) Uji Steroid

Ekstrak dimasukkan sedikit dalam tabung reaksi kecil, lalu dikocok dengan sedikit eter. Lapisan eter diambil lalu diteteskan pada plat tetes, dan dibiarkan sampai kering. Setelah kering, ditambahkan dua tetes asam asetat anhidrat dan satu tetes asam sulfat pekat. Apabila terbentuk warna orange, merah, atau kuning berarti positif terpenoid. Tetapi apabila terbentuk warna hijau berarti positif steroid (Sthahl (1969), Hendrajaya dan Kesuma (2003) cit Arifin *et al.* (2006)).

3) Uji Saponin

Fraksi air dikocok vertikal. Apabila terbentuk busa yang stabil selama 10 menit berarti positif saponin (Sthahl (1969), Hendrajaya dan Kesuma (2003) cit Arifin *et al.* (2006)).

4. Parameter Non Spesifik

a. Penetapan Susut Pengeringan

Satu gram sampai 2 g zat ditimbang dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Zat diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol, hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm sampai 10 mm, dimasukkan ke dalam ruang pengering,

buka tutupnya, keringkan pada suhu penetapan hingga bobot tetap. Sebelum pengeringan, botol dibiarkan dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu kamar. Jika suhu lebur zat lebih rendah dari suhu penetapan, pengeringan dilakukan pada suhu antara 5°C dan 10°C di bawah suhu leburnya selama 1 jam sampai 2 jam, kemudian pada suhu penetapan selama waktu yang ditentukan atau hingga bobot tetap (Depkes, 2000).

b. Penetapan Bobot Jenis

Suhu ekstrak diatur hingga lebih kurang 20°C , dimasukkan ke dalam piknometer yang bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C . Suhu piknometer yang telah diisi diatur hingga suhu 25°C . Bobot piknometer kosong dikurangkan dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air, dalam piknometer pada suhu 25°C (Depkes, 2000).

c. Penetapan Kadar Air

1) Metode Azeotropi

Tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan asam pencuci, kemudian dibilas dengan air, dikeringkan dilemari pengering. Kedalam labu pengering dimasukkan sejumlah ekstrak yang ditimbang saksama yang diperkirakan mengandung 2 ml sampai 4 ml air. Ekstrak ditimbang dalam

sehelai lembaran logam dengan ukuran yang sesuai dengan leher labu. Sekitar 200 ml toluen dimasukkan ke dalam labu, alat dihubungkan. Toluene dituang ke dalam labu tabung penerima melalui alat pendingin. Labu dipanaskan dengan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, disuling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian air tersuling. Kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluen, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan lebih dibasahi dengan toluen. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima pendingin dibiarkan hingga suhu kamar. Jika ada tetes air yang melekat pada pendingin tabung penerima, digosok dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen hingga tetesan air turun. Setelah air dan toluen memisah dengan sempurna, kemudian volume air dibaca. Dihitung kadar air dalam persen (Depkes, 2000).

2) Metode Susut Pengeringan

Lebih kurang 10 gram ekstrak dimasukkan dan ditimbang saksama ke dalam wadah yang telah ditara. Dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan

antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Depkes, 2000).

d. Penetapan Kadar Abu

1) Penetapan Kadar Abu Total

Lebih kurang 2 g sampai 3 g zat yang telah digerus dan ditimbang saksama, dimasukkan ke dalam krus platina atau krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, ratakan. Dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan, ditimbang. Dihitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes, 2000).

2) Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang telah diperoleh pada penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 ml asam sulfat encer P selama 5 menit, dikumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, disaring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, dipijarkan hingga bobot tetap, kemudian ditimbang. Dihitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes, 2000).

F. Skema Langkah Kerja