

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : Neraca analitik (Mettler Toledo) , blender, termometer, oven (Mettler UN55), *waterbath* (Mettler UN55), pH meter (Mettler Toledo) , kertas saring, aluminium foil, pipet tetes, labu ukur ukuran 500 ml, 100 ml, 25 ml, 10 ml dan 5 ml (Iwaki), gelas beker ukuran 1000 ml, 100 ml, dan 10 ml (Iwaki), gelas ukur ukuran 100 ml (Iwaki), erlenmeyer ukuran 1000 ml (Pyrex), tabung reaksi, corong pisah 250 ml (Pyrex), rak tabung reaksi, batang pengaduk, spatula, mikropipet P200 dengan rentang 20 μL – 200 μL (Dragon Onelab), alat *vacuum rotary evaporator* (Buchi) dan instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer *UV-Vis double beam* (Shimadzu UV-1900 Series).

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji pinang muda dan biji pinang tua (*Areca catechu L*) diperoleh dari Kelurahan Sei Selayur, lorong segaran 3 Kota

Palembang. Lalu media uji yang digunakan adalah *Bovine Serum Albumin* (Sigma-Aldrich).

Bahan kimia yang digunakan yaitu Etanol 96% (Merck), Aquades (Aqua DM), NaCl (Merck KGaA), *Tris base* (*Biogear*), asam asetat glasial (Merck KGaA), klorofom (Merck KGaA), HCl 2 N (Merck KGaA), H₂SO₄ (Mallinckrodt), FeCl₃ (Merck KGaA), bubuk Mg (Merck KGaA), reagen *Lieberman- Burchard* (Merck KGaA), reagen *Dragendorff* (Merck KGaA), kertas saring, *aluminium foil*.

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Preparasi Sampel

Buah pinang (*Areca catechu L*) di peroleh dari Kelurahan Sei Selayur, lorong segaran 3 Kota Palembang. Buah pinang yang diambil bewarna Hijau dan buah pinang yang menjelang masak bewarna kuning tua lalu dikupas kulit buahnya dan diambil bijinya. Biji tersebut dicuci dengan air bersih lalu dikeringkan di bawah sinar matahari pagi setelah kering biji pinang kemudian dihaluskan menggunakan blender, setelah itu diayak menggunakan ayakan lalu diperoleh serbuk biji pinang tua dan biji muda.

3.2.2 Ekstraksi Sampel

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi. Sebanyak 240,96 g masing-masing serbuk simplisia biji pinang muda dan biji pinang tua dimasukkan bejana maserasi dan ditambahkan masing-masing 1 liter etanol diekstraksi selama 1x24 jam karena jika waktu maserasi terlalu lama tidak akan berpengaruh lagi karena jumlah pelarut dalam zat terlarut telah jenuh lalu disimpan di tempat yang terlindung matahari sambil diaduk sesekali kemudian diambil filtratnya. Perlakuan dilakukan sebanyak 3x pengulangan. Hasil maserasi dikumpulkan dan disaring lalu ekstrak yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada temperatur 40°C dan diuapkan lagi menggunakan oven pada suhu 40°C hingga diperoleh masing-masing ekstrak etanol biji pinang tua dan biji pinang muda.

3.2.3 Uji Fitokimia

Larutan uji fitokimia terdiri dari ekstrak maserasi dari biji pinang [28].

a. Uji Alkaloid

Beberapa ml ekstrak sampel uji diambil kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pada sampel tersebut ditambahkan 1-2 mL reagen Dragendorff. Perubahan yang

terjadi diamati, hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk larutan dengan endapan merah jingga

b. Uji Flavonoid

Sejumlah ekstrak sampel diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan pada sampel berupa serbuk Magnesium 2 gram dan diberikan 3 tetes HCl pekat. Sampel dikocok dan diamati perubahan yang terjadi, terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada larutan menunjukkan adanya flavonoid.

c. Uji Saponin

Diambil beberapa ml ekstrak sampel kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 1-2 mL. Ditambahkan air panas pada sampel, reaksi positif jika terbentuk busa yang stabil selama 30 menit dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2 N.

d. Uji Terpenoid dan Steroid

Diambil beberapa ml ekstrak sampel kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 1-2 L, kemudian diteteskkan dengan pereaksi LiebermannBurchard, sehingga terbentuk warna merah atau violet, hasil ini

menunjukkan uji positif untuk terpenoid, terbentuknya cincin coklat, warna hijau atau biru menunjukkan hasil uji positif untuk steroid

e. Uji Tanin

Disiapkan ekstrak sampel sebanyak 1 mL, lalu ditambahkan 3 tetes larutan FeCl₃ 10%. Perubahan yang terjadi diamati, terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa tanin terhidrolisis dan apabila terbentuk endapan berwarna merah menunjukkan adanya senyawa tanin terkondensasi.

3.2.4 Perhitungan Rendemen Ekstrak

Persentase rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat}}{\text{Berat simplisia yang diekstraksi}} \times 100 \%$$

3.2.5 Uji *In Vitro* Aktivitas Antiinflamasi

Pengujian perbandingan aktivitas antiinflamasi dari ekstrak maserasi biji pinang muda dan biji pinang tua (*Areca catechu L*) dilakukan dengan uji *in vitro*. Melalui tahapan-tahapannya meliputi pembuatan larutan TBS (*Tris Buffer Saline*) sebanyak 500 mL, pembuatan larutan 0,2% BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebanyak 100 ml, pembuatan larutan

konsentrasi uji ekstrak maserasi, pembuatan larutan konsentrasi kontrol positif, pembuatan larutan kontrol negatif, pengukuran aktivitas antiinflamasi, perhitungan persentase penghambatan denaturasi protein dan perhitungan persentase nilai IC₅₀. Tahapan- tahapan ini dijelaskan sebagai berikut:

3.2.5.1 Pembuatan Larutan TBS (*Tris Buffer Saline*)

Tris base di ambil sebanyak 0,605 g dan NaCl diambil sebanyak 4,35 g lalu di tambahkan aquades sampai 400 mL. Selanjutnya untuk mengatur pH lalu pH di tambahkan asam asetat glasial untuk menstabilkan PH sampai mencapai pH 6,2-6,5 setelah itu tambahkan aquadest sampai 500 mL dalam labu ukur 500 mL[22].

3.2.5.2 Pembuatan larutan 0,2% BSA (*Bovine Serum Albumin*)

Ambil BSA (*Bovine Serum Albumin*) Sebanyak 0,2 g di masukkan ke dalam labu ukur 100 mL, Kemudian ditambahkan dengan larutan TBS (*Tris Buffer Saline*) hingga volume 100 mL[22].

3.2.5.3 Pembuatan larutan uji

Ekstrak maserasi sebanyak 50 Mg dari biji pinang muda dan biji pinang tua dilarutkan dalam pelarut etanol di

dalam labu ukur 25 mL, kemudian dicukupkan dengan pelarut sampai volume 25 mL, sehingga di dapatkan konsentrasi 2000 ppm sebagai larutan induk. Larutan induk dibuat konsentrasi sehingga menjadi larutan uji dengan konsentrasi 2000, 1500, 1000 dan 500 ppm [22]

3.2.5.4 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Sebanyak 50 μ L pelarut aquades lalu ditambahkan larutan 0,2% BSA ke labu ukur hingga volume mencapai 5 mL. Perlakuan diulangi menggunakan pelarut etanol [22].

3.2.5.5 Pengukuran Aktivitas Antiinflamasi

Diambil sebanyak 40 μ L dari setiap konsentrasilarutan uji kemudian ditambahkan larutan 0,2 % BSA hingga volume mencapai 5 mL dan di ambil larutan kontrol negatif yang telah dibuat. Campuran tersebut akan menghasilkan konsentrasi ekstrak yang berbeda, kemudian diinkubasi pada temperatur 25°C selama 20 menit, kemudian dipanaskan selama 10 menit pada temperatur 80-85°C dengan *waterbath*, dan didiamkan selama 25 menit pada suhu ruangan. Setelah dingin larutan dan dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometri *Uv-Visible* pada panjang gelombang 660 nm [22].

3.2.5.6 Perhitungan Persentase Penghambatan Denaturasi Protein

Persentase penghambatan denaturasi proteindiukur dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi larutan uji}}{\text{absorbansi kontrol negatif}} \times 100 \%$$

Senyawa yang menghambat denaturasi protein lebih besar dari 20% sudah dianggap sebagai sifat antiinflamasi dan dapat digunakan sebagai nilai acuan untuk pengembangan obat [21].

3.2.5.7 Perhitungan persentase Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ dihitung dengan membuat persamaan regresi linier antara konsentrasi (x) dengan % inhibisi (Y). Sehingga didapatkan nilai IC₅₀ dari ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*). Pada uji inhibisi ini, jika dihasilkan % inhibisi lebih dari 20%, maka dianggap memiliki aktivitas antiinflamasi [22].

