

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Bahan dan Alat Penelitian

4.1.1 Bahan Tanaman

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah dari tanaman cabe jawa dan merica hitam. Kedua tanaman tersebut diperoleh dan diidentifikasi dari Balai penelitian tanaman rempah dan obat (Balitro) Bogor.

Tabel IV.1 Spesifikasi buah tanaman yang diperoleh

Tanaman	Umur saat panen	Musim panen	Cara pengeringan
Cabe jawa	4 bulan	Kemarau	Menggunakan Oven 50 ⁰ C
Merica hitam	6 bulan	Kemarau	Menggunakan Oven 50 ⁰ C

4.1.2 Bahan kimia dan bahan lain

Bahan kimia yang digunakan untuk penelitian ini adalah n-Heksan p.a (merck), kloroform p.a (malinckorf), Plate TLC Silica Gel GF 254 merck.

4.1.3 Alat-alat

Moisture Analyzer HB43-S Mettler Toledo, Microwave Sharp R230-R(S), Ayakan No. 13 mm; 2- μ m pore; PTFE syringe filter, Linomat 5, Automatic Development Chamber 2, Camag TLC Visualizer, Camag TLC scanner 3, software WinCATS versi 1436336, software VMA solution versi 1.2.0b.

4.2 Metode Penelitian

4.2.1 Pembuatan serbuk simplisia

Buah cabe jawa dan merica hitam dalam kondisi kering. Kedua buah tanaman tersebut kemudian dibuat menjadi serbuk simplisia menggunakan blender. Setelah itu diayak menggunakan ayakan No. 100.

4.2.2 Penentuan kadar air serbuk simplisia

Pengukuran kandungan air yang berada di dalam serbuk simplisia tanaman cabe jawa dan merica hitam. Dengan menimbang 500,0 mg masing-masing serbuk simplisia, kemudian pengukuran menggunakan alat Moisture Analyzer. Simplisia dinilai cukup aman bila mempunyai kadar air kurang dari 10% (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1985).

4.2.3 Pembuatan Formula Campuran

Tabel IV.2 Komposisi tanaman untuk pembuatan formula campuran

BAHAN TANAMAN	F1	F2	F3
Merica Hitam	75%	50%	25%
Cabe Jawa	25%	50%	75%

Membuat 3 formula campuran sebanyak 100,0 gram tiap formulanya. Serbuk simplisia buah cabe jawa dan merica hitam ditimbang sesuai dengan komposisi dari tiap formula campurannya. (Komposisi tanaman untuk pembuatan formula campuran dilihat pada tabel IV.1). Setelah itu, diaduk dan diayak menggunakan ayakan No. 100.

4.2.4 Preparasi Sampel

Serbuk sampel formula campuran ditimbang 50,0 mg, dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL, lalu ditambahkan n-Heksan p.a 3,0 mL, diekstraksi menggunakan Microwave. Kemudian dalam labu ukur tersebut ditambahkan n-Heksan *ad* 5 mL atau sampai garis tanda. Tiap sampel disaring dengan menggunakan 13 mm, 2- μ m pore, PTFE syringe filter.

4.2.5 Optimasi kondisi

Pada tahap ini dilakukan penentuan fase gerak, penentuan konsentrasi sampel, penentuan jumlah larutan sampel yang ditotolkan dan penentuan panjang gelombang pada analisis menggunakan densitometri. Larutan sampel ditotolkan menggunakan Linomat-5 pada plat KLT silika gel 60 F254. Setelah totolan kering plat dieeluasi menggunakan ADC-2.

Noda yang diperoleh diamati di *TLC Scammer-3* pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Fase gerak yang terpilih adalah fase gerak yang dapat memisahkan peak terpilih dengan peak lain, dengan pemisahan paling baik berdasarkan nilai resolusi $> 0,8$ serta panjang gelombang sinar UV yang dapat menampakkan senyawa marker spesifik dari masing-masing tanaman.

4.2.6 Penentuan senyawa marker spesifik

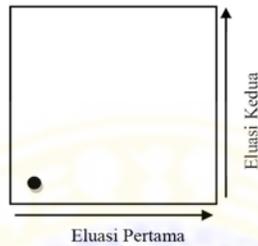
Penentuan senyawa marker spesifik dengan memilih salah satu senyawa pada masing-masing tanaman, yang hanya dimiliki tanaman itu saja. Senyawa yang terpilih harus memiliki resolusi $> 0,8$ dan memiliki *peak purity* $\geq 0,9900$. Sehingga dengan adanya senyawa marker spesifik didalam formula campuran, dapat menandakan keberadaan tanaman tersebut

4.2.7 Validasi metode

4.2.7.1 Stabilitas

Pertama stabilitas dalam pelarut, sampel pertama adalah formula campuran yang dilarutkan pada 8 jam sebelum penotolan, sampel kedua adalah formula campuran yang dilarutkan satu jam sebelum penotolan, sampel ketiga adalah formula campuran yang dilarutkan segera sebelum penotolan. Ketiga larutan sampel tersebut kemudian ditotolkan sebesar 35,0 μL menggunakan Linomat-5 pada satu plat KLT yang sama. Selanjutnya, diekspansi menggunakan fase gerak terpilih pada ADC-2, noda hasil pemisahan dilihat menggunakan Camag TLC Visualizer.

Kedua, stabilitas dalam plat. Larutan sampel ditotolkan menggunakan Linomat-5 sebesar 35,0 μ L pada plat KLT 10x10 cm sebanyak satu kali disalah satu sudut. Kemudian dieuasi menggunakan fase gerak yang terpilih pada ADC-2. Kemudian dilakukan eluasi kedua pada sisi yang tegak lurus pada sisi yang kedua setelah 2 jam dan 3 jam. Setelah eluasi, divisualisasikan menggunakan Camag TLC Visualizer.



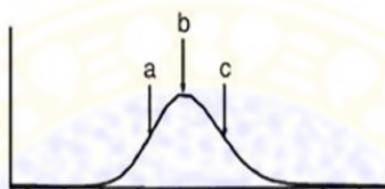
Gambar 4.1 Skematik arah eluasi uji stabilitas pada plat KLT

4.2.7.2 Presisi

Ketiga sampel formula campuran ditotolkan menggunakan Linomat-5 sebanyak 35,0 μ l pada plat KLT silika gel 60 F254 10x10 cm. Masing-masing sampel dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Selanjutnya, dieuasi menggunakan fase gerak terpilih dalam ADC-2, kemudian dilakukan analisis menggunakan Camag TLC Scanner-3 dan software WinCATS. Hal ini dilakukan 3 kali di 3 hari yang berbeda dengan komposisi eluen yang sama. Lalu nilai rasio area dari peak senyawa marker spesifik akan dibandingkan dengan peak yang sama tiap replikasinya sehingga diperoleh variabilitas *interday* dan *intraday*.

4.2.7.3 *Peak purity dan peak identity*

Pada tahap ini dilakukan *scanning* spektra pada masing – masing peak senyawa marker spesifik pada tiap tanaman. Untuk *peak identity* dilakukan dengan mengkorelasikan peak yang digunakan untuk standard dengan peak yang sama pada *track* yang berbeda. Sedangkan *peak purity* dilakukan dengan mengkorelasikan spektra pada awal peak dengan maksimum peak (r s,m) dan spektra pada maksimum peak dengan spektra pada akhir peak (r m,e). *Peak identity* dan *peak purity* diterima apabila memiliki nilai *correlation limit* > 0,9900.



Gambar 4.2 Skematik *peak purity* (Indrayanto dan Yuwono, 2005).

4.2.7.4 **Batas deteksi dan batas kuantitasi**

Untuk menentukan batas deteksi dan batas kuantitasi, masing-masing larutan sampel tanaman tunggal ditotolkan sampai di konsentrasi senyawa marker spesifik tidak tampak. Kemudian diambil 5 tingkat konsentrasi yang akan dilakukan perhitungan regresi linear dengan menggunakan *software VMA Solution*. Sehingga akan diketahui batas deteksi dan batas kuantifikasi dari masing – masing larutan sampel tanaman tunggal.

4.2.7.5 Linearitas

Tabel IV.3 Preparasi pembuatan kurva kalibrasi masing-masing tanaman

Konsentrasi	Berat serbuk	Volume larutan yang ditotolkan	Area senyawa marker spesifik
2.500 ppm	12,5 mg	35,0 μ L	
5.000 ppm	25,0 mg	35,0 μ L	
10.000 ppm	50,0 mg	35,0 μ L	
12.500 ppm	62,5 mg	35,0 μ L	

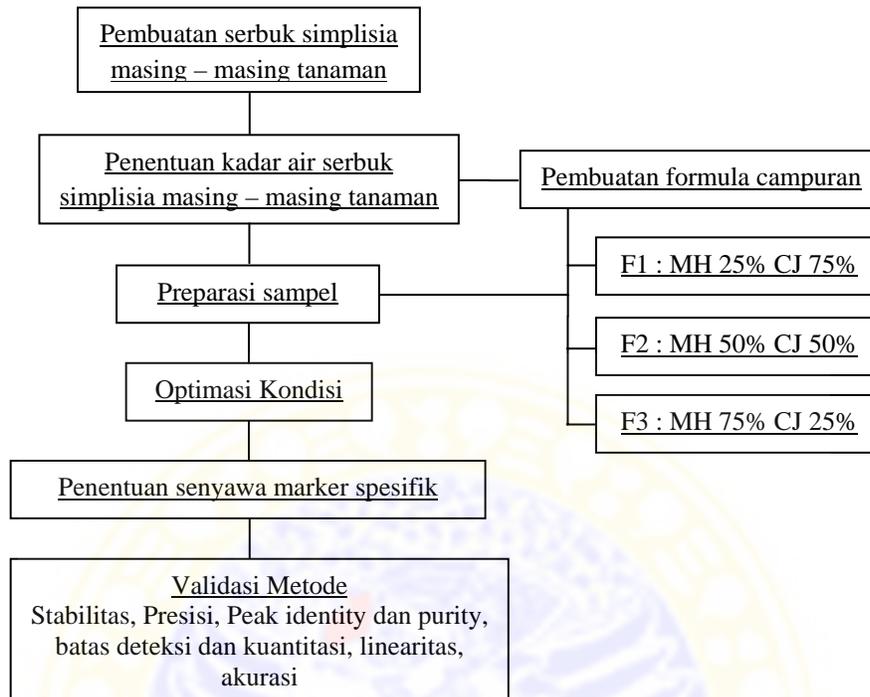
Serbuk simplisia merica hitam dan cabe jawa ditimbang sebanyak 5 kali dengan berat serbuk yang sesuai pada tabel 4.3. Kemudian masing – masing serbuk yang sudah ditimbang dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL, lalu ditambahkan n-Heksan p.a 3,0 mL, diekstraksi menggunakan Microwave. Kemudian dalam labu ukur tersebut ditambahkan n-Heksan *ad* 5 mL atau sampai garis tanda. Tiap sampel disaring dengan menggunakan 13 mm, 2- μ m pore, PTFE syringe filter. Langkah berikutnya adalah menotolkan 5 tingkat konsentrasi larutan sampel tersebut pada plat KLT. Kemudian dianalisis menggunakan densitometri pada lambda maksimum masing-masing senyawa marker spesifik. Setelah itu dilakukan perhitungan regresi linear antara area senyawa marker spesifik dengan berat serbuk simplisia.

4.2.7.6 Akurasi

Tiap formula campuran dilakukan penimbangan sebanyak 3 kali seberat 50,0 mg. Kemudian masing-masing dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL, lalu ditambahkan n-Heksan p.a 3,0 mL, diekstraksi menggunakan Microwave. Kemudian dalam labu ukur tersebut ditambahkan n-Heksan *ad* 5 mL atau sampai garis tanda. Tiap sampel disaring dengan menggunakan 13 mm, 2- μ m pore, PTFE syringe filter.

Langkah berikutnya adalah menotolkan tiap larutan sampel formula campuran yang telah dibuat sebanyak 35,0 μ L dengan menggunakan Camag-Linomat 5 bersamaan dengan 4 tingkat konsentrasi larutan sampel tanaman tunggal yang digunakan sebagai kurva kalibrasi pada plat KLT ukuran 20 x 10 cm. Kemudian dieluasikan dengan heksan:kloroform (0,5:3,5) menggunakan Camag ADC-2. Lalu setelah eluasi, plat dianalisis menggunakan densitometri pada lambda maksimum dari masing-masing senyawa marker spesifik. Area dari senyawa marker spesifik tiap tanaman pada masing-masing formula akan dimasukkan kedalam persamaan regresi yang didapat dari perhitungan regresi linear antara area senyawa marker spesifik pada tanaman tunggal dengan berat penimbangan masing-masing tingkat konsentrasinya. Selanjutnya dilakukan perbandingan antara berat sebenarnya masing-masing tanaman pada tiap formula dengan berat yang diperoleh dari hasil analisis menggunakan densitometri.

4.3 Skema Metode Penelitian



Gambar 4.3 Skematik metode penelitian