

BAB III

TATA KERJA

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat maserasi, *Spektrofotometri UV-VIS* (Shimadzu), timbangan analitik (Ohaus), tanur (Branstead Thermolyne), mesin oven pengering listrik (Agrowindo), oven (Jenaco YNC 30 L), *chamber*, kuvet, mikro pipet, mortir dan stemper, cawan penguap, spatel dan pisau.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah Sawo walanda, n-heksana, etil asetat, akuades, KOH (Merck), Mg (Merck), HCl (Merck), ammonia (Merck), kloroform (Merck), pereaksi *Dragendrof*, pereaksi *Mayer*, gelatin (Merck), FeCl₃ (Merck), eter (Merck), pereaksi *Lieberman-Burchard*, vanillin sulfat, toluen (Merck), CH₃COONa (Merck), asam galat (Sigma-Aldrich), Na₂CO₃ (Merck), asam askorbat (Merck), metanol p.a (Merck), n-heksan p.a (Fulltime), etil asetat (Merck), silica gel GF254, DPPH (Sigma-Aldrich), β-karoten (Sigma-Aldrich).

3.2 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi proses determinasi tanaman, pengeringan simplisia, skrining fitokimia, karakterisasi simplisia, ekstraksi secara maserasi, pengujian total flavonoid, pengujian total fenol, pengujian antioksidan dan pemantauan pola kromatogram.

3.2.1 Pengumpulan dan Determinasi Buah Sawo walanda

Tumbuhan Sawo walanda diperoleh dari Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Instalasi Perbenihan Hortikultura Subang Jawa-Barat dan di determinasi di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi FMIPA UNPAD.

3.2.2 Pengeringan Simplisia

Daun dan buah sawo walanda dicuci, kemudian diiris tipis dan dikeringkan dengan suhu pengeringan yaitu 40°C. Masing-masing sampel di oven pada suhu 40°C untuk daun di oven selama 9 jam dan untuk buah di oven selama 4 hari. Sehingga dihasilkan dua simplisia yaitu buah dan daun campolay (SB dan SD). Kemudian sampel yang telah dikeringkan diblender hingga menjadi serbuk simplisia.

3.2.3 Skrining Fitokimia

Dilakukan skrining fitokimia yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, fenolat, triterpenoid, stereroid, kuinon, saponin, monoterpen dan seskuiterpen. Skrining dilakukan pada simplisia maupun ekstrak. Adapun langkah kerjanya sebagai berikut :

A. Alkaloid

Sejumlah simplisia Sawo walanda dalam mortir, basahkan dengan amonia sebanyak 1 ml, kemudian tambahkan kloroform dan gerus kuat. Cairan kloroform disaring, filtrat ditempatkan dalam tabung reaksi dan tambahkan HCl 2N. Campuran dikocok, lalu biarkan hingga terjadi pemisahan. Dalam tabung reaksi terpisah :

Filtrat 1 : sebanyak 1 tetes larutan pereaksi *Dragendorf* diteteskan ke dalam filtrat, adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan atau kekeruhan berwarna hingga coklat.

Filtrat 2 : sebanyak 1 tetes larutan pereaksi *Mayer* diteteskan ke dalam filtrat, adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan atau kekeruhan berwarna putih.

Filtrat 3 : sebagai blangko atau kontrol negatif (Depkes RI, 1989).

B. Flavonoid

Sejumlah simplisia Sawo walanda masing-masing digerus dalam mortir dengan sedikit air. Kemudian pindahkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan sedikit Mg dan 5 tetes HCl 2N, seluruh campuran dipanaskan selama 5-10 menit. Setelah disaring panas-panas, filtrat dibiarkan dingin. Filtrat ditambahkan amil alkohol lalu dikocok kuat-kuat. Reaksi positif dengan terbentuknya warna merah pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1989).

- C. **Tanin**
Sebanyak 1 gram simplisia Sawo walanda masing-masing ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan gelatin akan timbul endapan putih yang menunjukkan adanya tanin setelah didiamkan sampai dingin (Depkes RI, 1989).
- D. **Fenolat**
Sebanyak 1 gram simplisia Sawo walanda masing-masing ditambahkan 100 ml air air panas, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Ditambahkan pereaksi FeCl_3 , timbul warna hijau biru kehitaman menunjukkan adanya fenol (Depkes RI, 1989).
- E. **Triterpenoid dan Steroid**
Serbuk simplisia Sawo walanda digerus dengan eter, kemudian fase eter diuapkan dalam cawan penguap hingga kering, pada residu ditetesi pereaksi Liberman-Burchard. Terbentuknya warna ungu menunjukkan kandungan triterpenoid sedangkan bila terbentuk warna hijau biru menunjukkan adanya senyawa steroid (Farnsworth, 1996).
- F. **Kuinon**
Serbuk simplisia Sawo walanda masing-masing ditambahkan air, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring dengan kapas. Pada filtrat ditambahkan larutan KOH. Terjadi warna kuning menunjukan adanya senyawa kuinon (Farnsworth, 1966).
- G. **Saponin**
Serbuk simplisia Sawo walanda masing-masing ditambahkan dengan air, dididihkan selama 5 menit kemudian di kocok. Terbentuknya busa yang konsisten delama 5-10 menit \pm 1 cm, berarti menunjukkan bahwa bahan uji mengandung saponin (Depkes RI, 1989).
- H. **Monoterpen dan Seskuioterpen**

Serbuk simplisia Sawo walanda masing-masing digerus dengan eter, kemudian fase eter diuapkan dalam cawan penguap hingga kering, pada residu ditetesi pereaksi vanillin sulfat. Terbentuknya warna-warni menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan sesquiterpen (Depkes RI, 1989).

3.2.4 Skrining Fitokimia Ekstrak

A. Alkaloid

Ekstrak ditimbang sebanyak 50 mg kemudian ditambahkan 3 ml ammonia dan 3 ml kloroform lalu dikocok kuat. HCL 0,2 N ditambahkan sebanyak 9 tetes, campuran dibagi menjadi 3 bagian.

Filtrat 1 : Ditambahkan dragendrof hasil positif menunjukkan kekeruhan.

Filtrate 2 : Ditambahkan pereaksi mayer hasil positif menunjukkan endapan putih atau keruh.

Filtrat 3 : digunakan sebagai control negative (Depkes RI, 1989).

B. Flavonoid

Ekstrak ditimbang sebanyak 100 mg ditambahkan air panas sebanyak 3 ml, kemudian panaskan kembali 5-10 menit lalu disaring dan dibiarkan dingin. Mg ditambahkan kedalam filtrat kemudian ditambahkan HCL 2N sebanyak 5 tetes. Filtrate dipanaskan kembali selama 5 menit, filtrate dibiarkan dingin dan ditambahkan amil alcohol sebanyak 1 ml. hasil positif menunjukkan warna merah pada lapisan amil alcohol (Depkes RI, 1989).

C. Tanin

Ekstrak kental ditimbang sebanyak 100 mg ditambahkan air panas sebanyak 3 ml kemudian dipanaskan kembali selama 5 menit, filtrate disaring dan dibiarkan dingin, kemudian ditambahkan 3 tetes gelatin. Hasil positif menunjukkan adanya endapan putih atau keruh (Depkes RI, 1989).

D. Fenol

Ekstrak kental ditimbang sebanyak 100 mg ditambahkan 5 ml air panas kemudian dipanaskan kembali selama 5 menit, lalu disaring

filtrate dibiarkan dingin kemudian ditambahkan FeCl_3 . Hasil positif menunjukkan warna hijau hingga biru (Depkes RI, 1989).

E. Triterpenoid dan Steroid

Beberapa ekstrak kental ditimbang kemudian di tambahkan eter, diambil fase eter dan dibiarkan menguap. Ditambahkan pereaksi Libermann-Buchard . hasil positif triterpenoid menunjukkan warna ungu dan hasil positif pada steroid menunjukkan warna hijau-biru (Farnsworth, 1966).

F. Saponin

Ekstrak kental ditimbang sebanyak 50 mg ditambahkan air panas sebanyak 5 ml, kemudian dipanaskan kembali 5-10 menit lalu dikocok kuat-kuat. Hasil positif menunjukkan adanya busa setinggi lebih kurang 1 cm selama 5-10 menit (Depkes RI, 1989).

G. Monoterpen dan Seskuiterpen

Ditimbang beberapa mg ekstrak kental kemudian ditambahkan eter sebanyak 1 ml lalu diambil fase eter, filtrate dibiarkan menguap kemudian ditambahkan vanillin asam sulfat 2 tetes. Hasil positif menunjukkan warna warni (Depkes RI, 1989).

H. Kuinon

Ekstrak kental ditimbang sebanyak 100 mg ditambahkan 5 ml air panas kemudian dipanaskan kembali selama 5 menit, lalu disaring filtrate dibiarkan dingin kemudian ditambahkan NaOH tetes. Hasil positif menunjukkan warna kuning (Farnsworth, 1966).

3.2.5 Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi dilakukan terhadap simplisia daun dan buah Sawo walanda, dilakukan dengan metode yang tertera pada Materia Medika Indonesia. Adapun tahapannya sebagai berikut :

A. Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air adalah suatu pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan (simplisia). Prinsip penetapan kadar air dilakukan dengan cara yang tepat diantaranya ada cara titrasi, destilasi atau gravimetri. Tujuan dari penetapan kadar air, yaitu :

memberikan batas minimal atau rentang besarnya kandungan air di dalam bahan (Depkes RI, 2000). Penentuan kadar air dilakukan dengan cara destilasi, yaitu dengan memasukan 5 gram serbuk simplisia, lalu ditambahkan 200 ml toluen jenuh air ke dalam labu yang telah berisi sampel uji, lalu dididihkan sampai toluen mendidih. Kemudian dilakukan penyulingan dengan kecepatan kurang dari 2 tetes perdetik, pada awal penyulingan dan dinaikan 4 tetes perdetik. Penyulingan dihentikan setelah seluruh air tersuling, maka dilakukan penyulingan kembali selama 5 menit. Setelah air dan toluen pada tabung penerima memisah, maka dilakukan perhitungan kadar air dengan cara menghitung volume air terhadap bobot kering simplisia (Depkes RI, 1989).

B. Penetapan Kadar Abu Total

Penetapan kadar abu merupakan metode pengukuran terhadap bahan yang dipanaskan pada temperatur tertentu dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sehingga yang tertinggal hanya unsur mineral dan anorganik dengan tujuan untuk memberikan gambaran mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak (Depkes RI, 2000). Timbang sebanyak 2 gram simplisia yang telah digerus, masukkan ke dalam cawan krus. Pijarkan hingga arang habis, dinginkan dan timbang. Jika arangnya tidak dapat menghilang, maka abu dipanaskan dalam larutan air panas, kemudian saring menggunakan kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan dan pijarkan hingga bobot tetap. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

C. Penetapan Kadar Sari Larut Air

Penetapan kadar sari larut air bertujuan untuk mengetahui kadar sari dari bahan yang terlarut di dalam pelarut air. Keringkan serbuk simplisia terlebih dahulu di udara, kemudian maserasi 5 gram serbuk simplisia selama 24 jam dengan 100 ml air-kloroform P,

dalam labu tersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Kemudian saring, 20 ml filtrat di uapkan hingga kering dalam cawan dangkal yang telah ditara, panaskan pada suhu 105 hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam air terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

D. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Penetapan kadar sari larut etanol bertujuan untuk mengetahui kadar sari dari bahan yang terlarut di dalam pelarut etanol. Keringkan serbuk simplisia terlebih dahulu di udara, kemudian maserasi 5 gram serbuk simplisia selama 24 jam dengan 100 ml etanol 95%, dalam labu tersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Kemudian saring, 20 ml filtrat di uapkan hingga kering dalam cawan dangkal yang telah ditara, panaskan pada suhu 105 hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

E. Susut Pengerinan

Susut pengerinan memiliki untuk memberikan batasan maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengerinan. Kecuali dinyatakan lain, suhu penetapan adalah 105 dan susut pengerinan ditetapkan sebagai berikut : timbang seksama 1 gram sampai 2 gram zat dalam bobol timbangan dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu penetapan selama 30 menit dan telah ditara. Ratakan bahan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm sampai 10 mm. Masukkan ke dalam ruang pengerin, buka tutupnya, keringkan pada suhu penetapan hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengerinan, biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin didalam desikator hingga suhu ruang (Depkes RI, 2008).

3.2.6 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut n-heksan, etil asetat, n-heksan:etil asetat (1:1). Sampel uji berupa simplisia buah dan daun sawo walanda. Masing-masing simplisia ditimbang sebanyak 50 gram buah dan 50 gram daun. Ekstraksi masing-masing simplisia menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, n-heksan:etil asetat (1:1) selama 48 jam dilakukan pergantian pelarut dan diaduk sesekali, pelarut yang digunakan sebanyak 600 ml. Ekstrak yang telah diperoleh kemudian diperkatkan dengan cara didiamkan pada suhu ruang. Dengan demikian diperoleh 6 macam ekstrak yaitu ekstrak buah n-heksana (EBn), ekstrak buah etil asetat (EBe), ekstrak buah n-heksan:etil asetat (EBne) dan ekstrak daun n-heksana (EDn), ekstrak daun etil asetat (EDe), ekstrak daun n-heksan:etil asetat (EDna) dengan pengeringan pada suhu 40. Setelah mendapat ekstrak kental, persen rendemen dihitung dengan rumus :

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat (gram)}}{\text{bobot simplisia (gram)}} \times 100\%$$

3.2.7 Penetapan Kadar Total Karotenoid

Penentuan kadar total karotenoid diadopsi dari Thaipong, *et al* 2006. Jumlah kandungan karotenoid diukur menggunakan β -karoten sebagai standar, β -karoten dilarutkan sebanyak 2,5 mg dengan n-heksan pro analisis dalam 50 ml dan dibuat variasi konsentrasi 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 bpj, digunakan untuk memperoleh kurva standar. Masing-masing ekstrak dilarutkan dalam n-heksan pro analisis. Absorbansi diukur pada λ 477 nm. Analisis dilakukan sebanyak triplo dengan variasi konsentrasi dan digunakan sebagai kurva standar. Metode menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Kadar karotenoid dilaporkan sebagai persentasi dari total β -karoten equivalen pe 100 g ekstrak (g BET/100 g) (Fitriansya., 2017; Thaipong 2006).

3.2.8 Uji Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Buah dan Daun Sawo Walanda.

A. Pembuatan Larutan DPPH

DPPH dibuat larutan baku dengan konsentrasi 50 bpj. DPPH ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan metanol p.a hingga 100 mL kemudian diukur absorbansi. Lalu dibuat penenceran dari 50 bpj menjadi 30 bpj dan dilarutkan kembali dalam 100 ml metanol p.a kemudian diukur absorbansi DPPH.

- B. **Pengujian Larutan Pembanding Dengan Standar Asam Askorbat**
Asam askorbat ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dalam 100 ml metanol sebagai larutan standar asam askorbat 50 bpj, kemudian dibuat variasi konsentrasi larutan standar asam askorbat 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 bpj. Sebanyak 2 ml larutan uji pada setiap variasi konsentrasi diambil dan ditambahkan larutan DPPH sebanyak 2 mL, kemudian larutan diinkubasi selama 30 menit. Pengukuran absorbansi dengan menggunakan *spektrofotometri UV-Vis* pada panjang gelombang 517 nm, dilakukan sebanyak triplo (Blois, 1958).
- C. **Pengujian Aktivitas Antioksidan**
Pengujian aktivitas antioksidan diadopsi dari metode blois 1958. Larutan yang diuji terdiri dari ekstrak (EBn), (EBe), (EBne) dan (EDn), (EDe), (EDna). Pembuatan larutan uji dibuat dengan cara menimbang masing-masing ekstrak dan dilarutkan dengan metanol diambil sebanyak 2 mL larutan setiap sampel dengan beberapa variasi konsentrasi. Tambahkan 2 mL DPPH kemudian campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit. Ukur absorbansi dengan spektrofotometri UV-Visible pada panjang gelombang 517 nm (Blois 1958).
- D. **Penentuan IC_{50} Terhadap Peredaman DPPH**
Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung presentase peredaman DPPH dan membuat kurva kalibrasi dengan persentasi peredaman DPPH menggunakan linieritas. IC_{50} dihitung dengan memasukan nilai 50 dalam persamaan linier sebagai y kemudian dihitung x. Hasil yang diperoleh merupakan konsentrasi IC_{50} (Kristina, 2018).

3.2.9 Pemantauan Pola Kromatogram Karotenoid

Dilakukan pemantauan KLT terhadap masing-masing ekstrak kental (EBn), (EBe), ekstrak (EBne) dan (EDn), (EDe), (EDna). Fase diam yang digunakan adalah silica gel GF254, pengembang yang digunakan adalah n-Heksana : etil asetat. Identifikasi pada UV 254 dan 366 untuk melihat senyawa Karotenoid. Dari hasil pemantauan pola kromatogram ini diharapkan dapat mengetahui senyawa antioksidan mana yang berperan dalam menangkap radikal bebas (Fitriansyah Dkk .,2017.).

Pengujian ini hanya untuk melihat dari segi warna dan bukan dilihat dari nilai Rf nya apakah terdapat karotenoid dari masing-masing ekstrak daun dan buah, pemantauan pola kromatogram untuk karotenoid ini dilihat secara *visible* dengan melihat warna kuning hingga jingga yang akan terelusi menggunakan eluen semipolar-nonpolar.