

BAB III

TATA KERJA

3.1 Alat

Alat yang digunakan adalah timbangan neraca analitik (OHAUS®), oven, mortir, stamper, alat maserasi, spektrofotometer Uv-Vis, kertas saring, plat KLT, chamber, cawan krus, alat distilasi, piknometer (Pyrex®), *rotary vaporator* (IKA®), dan alat-alat gelas (pyrex®) yang biasa digunakan di Laboratorium.

3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah malaka (*Phyllanthus emblica*) yang diperoleh dari kota berebes, etanol 96% , aquadest , pereaksi FeCl₃, AlCl₃, magnesium, Kloroform, KOH , H₂SO₄, vanillin sulfat, amonia, HCl, klorida, methanol p.a, asam galat, silica GF₆₀, n-butanol, asam asetat glasial, kuersetin (Sigma aldrich), DPPH (Sigma aldrich), folin-clocalteu (Sigma aldrich), asam galat (sigma aldich), natrium karbonat, kalium asetat, pereaksi Liberman Burchad, pereaksi dragendroff, pereaksi mayer, NaOH 1 N dan Toluene.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman malaka dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi FMIPA, Universitas Padjadjaran Jatinangor.

3.3.2 Pengumpulan dan Pengolahan Tanaman Uji

Buah, dicuci kemudian disortasi, dan dirajang. Setelah dilakukan perajangan dilakukan pengeringan dengan menggunakan oven dengan suhu 40-50°C, kemudian disortasi kering dan dihaluskan. Hal ini penting untuk mengupayakan proses ekstraksi yang maksimal.

3.3.3 Skrining Fitokimia

Dilakukan skrining fitokimia terhadap senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, polifenol, triterpenoid, steroid, kuinon, saponin, monoterpen, dan seskuiterpen. Adapun langkah kerjanya adalah sebagai berikut :

A. Alkaloid

Sejumlah sampel dalam mortir, dibasakan dengan amonia sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan kloroform dan digerus kuat. Cairan kloroform disaring, filtrat ditempatkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan HCl 2N, campuran dikocok, lalu dibiarkan hingga terjadi pemisahan. Dalam tabung reaksi terpisah:

Filtrat 1 : Sebanyak 1 tetes larutan pereaksi Dragendorff 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 sampel digerus dalam mortir dengan sedikit air, pindahkan dalam tabung reaksi, ditambahkan sedikit logam magnesium dan 5 tetes HCL 2N, seluruh campuran dipanaskan selama 5-10 menit. Setelah disaring panas-panas dan filtrat dibiarkan dingin, kepada 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 sampel ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit kemudian saring. Filtrat sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan gelatin akan timbul endapan putih, bila ada tanin (Depkes RI, 1989).

D. Polifenol

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat sebanyak 3 ml kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditetesi pereaksi besi (III) klorida. Adanya fenolat dalam sampel ditandai dengan munculnya warna biru-hitam (Depkes RI, 1989).

- E. Monoterpen dan sesquiterpen
Simplisia digerus dengan eter, kemudian fase eter diuapkan dalam cawan penguap hingga kering, pada residu ditetesi pereaksi larutan vanilin sulfat atau anisaldehyd sulfat. Terbentuknya warna-warni menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan sesquiterpen (Depkes RI, 1989).
- F. Steroid dan triterpenoid
Serbuk simplisia digerus dengan eter, kemudian fase eter diuapkan dalam cawan penguap hingga kering, pada residu ditetesi pereaksi Lieberman-Burchard. Terbentuknya warna ungu menunjukkan kandungan triterpenoid sedangkan bila terbentuk warna hijau biru menunjukkan adanya senyawa steroid (Farnsworth, 1966).
- G. Kuinon
Sampel ditambahkan dengan air, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring dengan kertas saring. Pada filtrat ditambahkan larutan NaOH 1 N. Terjadinya warna merah menunjukkan bahwa dalam bahan uji mengandung senyawa golongan kuinon (Farnsworth, 1966).
- H. Saponin
Sampel ditambahkan dengan air, dididihkan selama 5 menit kemudian dikocok. Terbentuknya busa yang konsisten selama 5-10 menit = 1 cm berarti menunjukkan bahwa bahan uji mengandung saponin (Depkes RI, 1989).

3.3.4 Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi dilakukan terhadap simplisia buah malaka, 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). Penentuan kadar air dilakukan dengan cara destilasi. 5 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam labu, lalu 200 ml toluen jenuh air ditambahkan ke dalam labu yang telah berisi sampel uji, lalu toluen dididihkan. Kemudian penyulingan

dilakukan dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes perdetik, pada awal penyulingan dan dinaikkan 4 tetes perdetik. Penyulingan dihentikan setelah seluruh air tersuling. Untuk mengantisipasi masih adanya air yang belum 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 (Ditjen POM, 2000). Simplisia uji yang sudah ditimbang sebanyak 2 gram dan digerus halus dan dimasukkan ke dalam cawan krus. Kemudian simplisia dipijarkan hingga arangnya habis, didinginkan dan ditimbang. Jika arangnya tidak dapat hilang, maka abu dipanaskan dalam larutan aquadest, kemudian dilakukan penyaringan dengan kertas saring bebas abu, sisa dan kertas saring dibiarkan pada cawan krus yang sama. Filtratnya dimasukkan pada cawan krus, diuapkan dan dipijar sampai bobotnya tetap, kemudian ditimbang. Kadar abu total dihitung terhadap simplisia yang sudah dikeringkan diudara (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. Serbuk simplisia kering terlebih dahulu dikeringkan di udara, kemudian 5 gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan menggunakan 100 mL air kloroform P (1000:2,5), dalam labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring, dan 20 ml filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, kemudian

dihitung terhadap bobot bahan yang telah dikeringkan (DepkesRI, 1989).

D. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

yang sudah dikeringkan (DepkesRI, 1989). Penetapan kadar sari larut etanol dilakukan untuk mengetahui kadar sari dari bahan yang terlarut di dalam pelarut etanol. Serbuk simplisia terlebih dahulu dikeringkan di udara, kemudian 5 gram serbuk simplisia 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 menghindari penguapan etanol. Kemudian 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, kemudian sisa dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol 95% dihitung terhadap bobot.

3.3.5 Ekstraksi

A. Metode Ekstraksi Maserasi

Buah malaka halus ditimbang sebanyak 500 gram lalu dimasukkan ke dalam botol gelap, ditambahkan 500 mL pelarut etanol 96%, direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali dikocok, kemudian didiamkan 18 jam berikutnya, disaring menggunakan kain kasa steril dan kertas saring yang telah disterilisasi, ampas yang didapat kemudian dimaserasi kembali dengan perlakuan yang sama.

B. Evaporasi

Larutan ekstrak dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan dipasangkan ke alat *rotary vacuum evaporator*. Ditambahkan aquades pada wadah air hingga batas normal, menyalakan pompa vakum dan mengatur alat *rotary vacuum evaporator*. Pada suhu 50°C, tekanan 20 Psi dan putaran 120 rpm, proses pemekatan dihentikan pada saat mulai terlihat batas garis tebal pada dasar labu dan larutan mulai kental berwarna kuning jingga.

3.3.6 Ekstrak kental

Dilakukan skrining fitokimia terhadap senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, polifenol, triterpenoid, steroid, kuinon, saponin, monoterpen, dan seskuiterpen.

3.3.7 Penyimpanan

Ekstrak kental disimpan dikulkas pada suhu dingin 4°C dengan keadaan tertutup, kemudian di ambil setelah penyimpanan pada 15, 30 dan 45 hari untuk diuji kualitatif dan kuantitatif.

3.3.8 Uji kualitatif

- A. Uji KLT fenolik sebanyak 2,0 μ L larutan uji dalam methanol p.a dan standar asam galat 0,5% dalam etanol masing-masing ditotolkan pada plat KLT silica GF₆₀ kemudian dielusi menggunakan fase kloroform : Methanol (7:3). Bercak diamati dengan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm kemudian disemprot dengan reagen FeCl₃. Plat dibiarkan mengering lalu diamati kembali pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Dihitung nilai Rf asam galat dan sampel.
- B. Uji KLT flavonoid. Sebanyak 2,0 μ L larutan uji dalam methanol p.a ditotolkan pada plat KLT silica GF₆₀ bersama dengan standar kuersetin 2% dalam methanol plat dielusi dengan fase gerak kloroform : Methanol (7:3). Bercak dideteksi dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm kemudian disemprot dengan reagen AlCl₃. Warna bercak larutan uji dan standar diamati pada sinar UV 254 nm dan 366 nm lalu dihitung nilai Rf masing-masing standard an sampel.

3.3.9 . Uji kuantitatif

A. Penetapan Kadar Total Flavonoid

1. Pembuatan Kurva Kalibrasi Menggunakan Standar Kuersetin

Timbang sebanyak 10 mg kuersetin dan dilarutkan dalam 100 ml metanol sebagai larutan standar kuersetin 100 bpj, kemudian dibuat variasi konsentrasi larutan standar kuersetin 25, 30, 45, 60, 75 dan 90 bpj. Larutan standar diambil sebanyak 0,5 ml, kemudianditambahkan 1,5 ml methanol, 0,1 ml AlCl₃ 10%, 0,1 ml CH₃COONa 1M dan 2,8 ml aquades. Larutan diinkubasi selama 30

menit di tempat gelap pada suhu ruang. Pengukuran absorbansi dengan menggunakan *spektrofotometri UV-Vis* pada panjang gelombang 415 nm (Chang, 2002). Kurva kalibrasi dibuat, sehingga diperoleh persamaan regresi linier.

2. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Larutan yang di uji terdiri dari ekstrak kental buah malaka, masing-masing dilarutkan dalam metanol. Sebanyak 0,5 ml pada setiap sampel diambil dan ditambahkan dengan 1,5 ml methanol, 0,1 ml AlCl_3 10%, 0,1 ml CH_3COONa 1M, dan 2,8 ml aquades. Larutan diinkubasi selama 30 menit di tempat gelap pada suhu ruang. Pengukuran absorbansi dengan menggunakan *spektrofotometri UV-Vis* pada panjang gelombang 415 nm (Chang, 2002). Penetapan kadar total flavonoid dihitung menggunakan regresi linier dari kurva kalibrasi kuersetin dan dinyatakan sebagai kuersetin ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_7$) ekuivalen per 100 gram ekstrak (g QE/100 g).

B. Penetapan Kadar Total Fenol

1. Pembuatan Kurva Kalibrasi Menggunakan Standar Asam Galat

Timbang sebanyak 40 mg asam galat dan dilarutkan dalam 100 ml metanol sebagai larutan standar asam galat 400 bpj, kemudian dibuat variasi konsentrasi larutan standar asam galat 20, 40, 60, 80, 100 bpj. Dalam 0,5 ml larutan asam galat berbagai variasi konsentrasi ditambahkan 5 ml pereaksi *Folin-Ciocalteu* (1:10), 4 ml Na_2CO_3 1M, kemudian larutan diinkuasi selama 15 menit. Pengukuran absorbansi dengan menggunakan *spektrofotometri UV-Vis* pada panjang gelombang 765 nm (Pourmorad, 2006). Kurva kalibrasi dibuat, sehingga diperoleh persamaan regresi linier.

2. Penetapan Kadar Fenol Total

Larutan yang di uji yang terdiri dari ekstrak kental buah malak, masing-masing dilarutkan dalam metanol. Sebanyak 0,5 ml larutan pada setiap sampel diambil ditambahkan 5 ml pereaksi *Folin-Ciocalteu* (1:10), 4 ml Na_2CO_3 1 M kemudian larutan diinkuasi selama 15 menit. Pengukuran absorbansi dengan menggunakan

spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm (Pourmorad,2006). Penetapan kadar total fenol dihitung menggunakan regresi linier dari kurva kalibrasi asam galat dan dinyatakan sebagai asam galat ($C_7H_6O_5$) ekuivalen per 100 gram ekstrak (g GAE/100 g).

C. Uji aktivitas antioksidan

1. Pembuatan Larutan DPPH

Dibuat larutan DPPH dengan konsentrasi 50 bpj. Ditimbang sebanyak 5 mg DPPH dan dilarutkan dengan metanol p.a hingga 100 mL.

2. Pengujian Larutan Perbandingan Dengan Standar Asam Askorbat

Timbang sebanyak 5 mg asam askorbat dan dilarutkan dalam 100 ml metanol sebagai larutan standar asam askorbat 50 bpj, kemudian dibuat variasi konsentrasi larutan standar asam askorbat 5, 10, 20, 30, dan 40 bpj. Sebanyak 2 ml larutan uji pada setiap variasi konsentrasi diambil, kemudian larutan diinkuasi selama 30 menit. Pengukuran absorbansi dengan menggunakan *spektrofotometri UV-Vis* pada panjang gelombang 517 nm, dilakukan secara triplo (Blois, 1958).

3. Penetapan Aktivitas Antioksidan

Larutan yang di uji yang terdiri dari ekstrak kental buah malaka. Pembuatan larutan uji dilakukan dengan cara menimbang ekstrak dan dilarutkan dalam metanol. Diambil sebanyak 2 ml larutan pada setiap sampel dengan berbagai variasi konsentrasi. Tambahkan 2 ml DPPH, kemudian larutan diinkuasi selama 30 menit. Pengukuran absorbansi dengan menggunakan *spektrofotometri UV-Vis* pada panjang gelombang 517 nm (Blois, 1958).

4. Penentuan IC_{50} Terhadap Peredaman DPPH

Absorbansi sampel uji yang diperoleh digunakan untuk menghitung persentasi peredaman DPPH dan membuat kurva kalibrasi dengan persentasi peredaman DPPH menggunakan linieritas. IC_{50} dihitung dengan cara memasukkan nilai 50 kedalam persamaan linier

sebagai y, kemudian dihitung nilai x. Hasil yang diperoleh merupakan konsentrasi IC₅₀ (Kristina, 2018).

Nilai serapan larutan DPPH terhadap sampel tersebut dinyatakan dengan persen inhibisi (% inhibisi) dengan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$