

## **BAB III**

### **TATA KERJA**

#### **3.1 Alat**

Alat yang digunakan adalah panci perebusan, timbangan analitik (*Henrerr*<sup>®</sup>), tanur (*Branstead Thermolyne*<sup>®</sup>), oven (*Memmert*<sup>®</sup>), *rotary vaporator* (*IKA*<sup>®</sup>), tabung reaksi (*pyrex*<sup>®</sup>), corong, cawan krus, gelas ukur, *beaker glass*, pipet tetes, batang pengaduk, Spektrofotometer *UV-Vis* (*Shimadzu*<sup>®</sup> 1800), kuvet, mikro pipet (*Socorex*<sup>®</sup>), mortir & stamper, cawan penguap, spatel, kaca arloji, dan lemari pendingin (*Polytron*).

#### **3.2 Bahan**

Bahan yang digunakan buah mengkudu segar dari (Manoko), serbuk simplisia buah mengkudu dari Jawa Timur dan Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan ammonia, aquadest asam klorida 2N, kloroform, serbuk magnesium, asam sulfat pekat, metanol (*Fulltime*<sup>®</sup>), DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl*), natrium asetat, asam asetat anhidrat, asam klorida 0,1N, besi (III) klorida, larutan gelatin, amil alkohol, eter, larutan vanillin, KOH 5%, pereaksi Dragendrof (Bismut nitrat, KI) pereaksi Liberman Buchard (Asam asetat anhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kloroform), pereaksi Mayer asam galat (Sigma-Aldrich), etanol 96%, Natrium karbonat, reagen Folin-Ciocalteu, dan Kuersetin (Sigma-Aldrich), Alumunium Klorida, Asam Askorbat.

#### **3.3 Metode Penelitian**

Metode penelitian meliputi proses determinasi tanaman, pengumpulan dan pengolahan tanaman uji, pengeringan simplisia, skrining fitokimia, perebusan, penguapan, pengujian parameter spesifik dan non spesifik ekstrak, penetapan kadar total fenol, kadar total flavonoid, dan uji aktivitas antioksidan.

##### **3.3.1 Determinasi Tanaman**

Mengkudu dari Manoko dideterminasi di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi FMIPA UNPAD.

### 3.3.2 Pengumpulan dan Pengolahan Tanaman Uji

Buah mengkudu diperoleh dari kebun percobaan dari Manoko, Lembang Kabupaten Bandung Barat. Pengolahan bahan meliputi sortasi basah, pencucian, penirisan, perajangan, pengeringan, dan sortasi kering.

### 3.3.3 Metode Pengeringan dan Suhu Pengeringan

Mengkudu yang sudah dibersihkan diiris tipis-tipis, kemudian di keringkan dengan oven pada suhu 50°C.

### 3.3.4 Skrining Fitokimia

Dilakukan skrining fitokimia yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, 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 (MMI, 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 (MMI, 1989).

C. Polifenol

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 pereaksi besi (III) klorida akan timbul warna hijau biru kehitaman yang menunjukkan adanya senyawa polifenol (MMI, 1989).

D. 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 pereaksi gelatin akan timbul endapan putih yang menunjukkan adanya senyawa tanin (MMI, 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 (MMI, 1989)

F. Steroid dan Triterpenoid

Serbuk simplisia digerus dengan eter, kemudian fase eter diuapkan dalam cawan penguap hingga kering, pada residu ditetesi pereaksi Liebermann-Burchard. Terbentuknya warna ungu menunjukkan kandungan triterpenoid sedangkan bila terbentuk warna hijau biru menunjukkan adanya senyawa steroid (MMI, 1989).

G. Kuinon

Sampel ditambahkan dengan air, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring dengan kapas. Pada filtrat ditambahkan larutan NaOH 1 N. Terjadinya warna merah menunjukkan bahwa dalam bahan uji mengandung senyawa golongan kuinon (MMI, 1989).

#### H. Saponin

Sampel ditambahkan dengan air, dididihkan selama 5 menit kemudian dikocok. Terbentuknya busa yang konsisten selama 5-10 menit  $\pm$  1 cm, berarti menunjukkan bahwa bahan uji mengandung saponin (MMI, 1989).

#### 3.3.5 Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi dilakukan terhadap simplisia mengkudu 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 batasan minimal atau rentang besarnya kandungan air di dalam bahan (Ditjen POM, 2000). Penentuan kadar air dilakukan dengan cara destilasi, yaitu dengan memasukkan 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 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, dimasukkan ke dalam cawan krus. Kemudian 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 dipijarkan 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 (Depkes RI, 1989).

D. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Penetapan kadar sari larut etanol dilakukan untuk mengetahui kadar sari dari bahan yang terlarut di dalam pelarut etanol. Serbuk simplisia terlebih dahulu dikeringkan diudara, 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 yang sudah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

#### E. Susut Pengerinan

Susut pengerinan adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan dengan cara yang telah ditetapkan. Kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi, simplisia harus dalam bentuk serbuk dengan derajat halus nomor 8, suhu pengerinan 105°C dan susut pengerinan ditetapkan sebagai berikut: ditimbang seksama 1 sampai 2 g simplisia dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu penetapan dan ditara. Diratakan bahan dalam botol ditimbang dengan menggunakan botol, hingga merupakan lapisan setebal kurang 5 sampai 10 mm, dimasukkan dalam ruang pengering, dibuka tutupnya, dikeringkan pada suhu penetapan hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengerinan, dibiarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu ruang (Depkes RI, 2008)

#### 3.3.6 Ekstraksi dengan Metode Perebusan

Metode yang digunakan untuk penelitian ini adalah dengan metode perebusan. Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah daging buah, yang telah dikeringkan. Sampel yang telah dikeringkan selanjutnya dibuat serbuk dengan cara dihancurkan dengan alat blender. Sebanyak 100 g buah mengkudu kering. Simplisia diekstraksi dengan metode perebusan dengan menggunakan akuades sebanyak 1500 mL dengan suhu 90°C selama 15 menit. Setelah didapatkan ekstrak cair kemudian diuapkan diatas *waterbath*, dan didapatkan ekstrak kental.

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

### 3.3.7 Karakterisasi Ekstrak

#### A. Organoleptis

Penggunaan pancaindera mendeskripsikan bau, rasa sebagai berikut: Bentuk (padat, serbuk-kering, kental, cair) warna (coklat, kuning dan lain-lain), bau (aromatik, tidak berbau dan lain-lain), rasa (pahit, manis, kelat dan lain-lain ) (Depkes RI, 2000).

#### B. Bobot Jenis

Digunakan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang dimasukkan kedalam piknometer. Dimasukkan ke dalam piknometer, dibuang kelebihan ekstrak cair dan timbang. Kurangkan bobot piknometer kosong dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air dalam piknometer (Depkes RI, 2000).

#### C. Profil KLT

Filtrat ekstrak ditotolkan pada plat silika Gel GF 254 untuk ekstrak air mengkudu, dilarutkan dengan metanol, lalu dikeringkan dan diamati pada *UV-Visible* 254 nm dan 366 nm, sampel disemprot dengan penampak bercak  $\text{FeCl}_3$ , DPPH dan  $\text{AlCl}_3$  (Depkes, 2000).

### 3.3.8 Penetapan Kadar Total Fenolik

#### A. Pembuatan Kurva Kalibrasi Menggunakan Standar Asam Galat

Sebanyak 20 mg asam galat ditimbang dan dilarutkan dalam 100mL metanol sebagai larutan standar asam galat 200 bpj. Variasi konsentrasi 80, 100, 120, 140, 160 bpj. Sampel ditambahkan 5mL pereaksi *folin-ciocalteu* (1;10), 4 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M, larutan diinkubasi selama 15 menit (Pourmorad, *et al.*, 2006). Pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis yang telah termodifikasi pada panjang gelombang 740 nm. Kurva kalibrasi dibuat, sehingga diperoleh persamaan regresi linier.

#### B. Penetapan Kadar Fenol Total

Larutan yang di uji terdiri dari ekstrak (Jawa Barat, Jawa Timur dan Jawa Tengah), 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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M, kemudian larutan diinkubasi selama 15 menit (Pourmorad, *et al.*,2006). Pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri Uv-Vis yang telah termodifikasi pada panjang gelombang 740 nm. Penetapan kadar fenol total dihitung menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi asam galat dan dinyatakan sebagai asam galat (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) ekuivalen per 100 gram ekstrak (gGAE/100g).

### 3.3.9 Penetapan Kadar Total Flavonoid

#### A. Pembuatan Kurva Kalibrasi Menggunakan Standar Kuersetin

Sebanyak 5 mg kuersetin ditimbang dan dilarutkan dalam 25 mL metanol sebagai larutan standar kuersetin 200 bpj, kemudian dibuat variasi konsentrasi larutan standar kuersetin konsentrasi 50; 40; 30; 25; 15 bpj. Sampel ditambahkan 1,5 mL metanol ditambahkan 0,1 mL AlCl<sub>3</sub> 10% ditambahkan 0,1 mL natrium asetat 1M ditambahkan 2,8 mL akuades. Larutan diinkubasi selama 15 menit (Chang, *et al.*,2002). Pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis yang telah termodifikasi pada panjang gelombang 429 nm. Kurva kalibrasi dibuat, sehingga diperoleh persamaan regresi linier.

#### B. Penetapan Kadar Total Flavonoid Total

Larutan yang di uji terdiri dari ekstrak (Jawa Barat, Jawa Timur dan Jawa Tengah), masing-masing dilarutkan dalam metanol. Sebanyak 0,5 mL pada setiap sampel diambil dan ditambahkan 1,5 mL metanol, 0,1 mL aluminium (III) klorida 10% 0,1 mL, 0,1 mL Natrium asetat 1M, dan 2,8 mL akuades, diinkubasi selama 15 menit (Chang, *et al.*,2002). Pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri Uv-Vis yang telah termodifikasi pada panjang gelombang 429 nm. Penetapan kadar flavonoid total dihitung menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi



kuersetin dan dihitung sebagai kuersetin per 100 gram ekstrak (gGAE/100g).

### 3.3.10 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Mengkudu

#### A. Pembuatan Larutan DPPH

Dibuat larutan DPPH dengan konsentrasi 50  $\mu\text{g/mL}$ . Ditimbang sebanyak 5 mg DPPH dan dilarutkan dengan metanol p.a hingga 100 mL. Kemudian diukur panjang gelombang serapan maksimum 517 nm.

#### B. Dibuat larutan induk dengan cara ditimbang ekstrak dimasukkan dalam gelas kimia kemudian ditambahkan metanol p.a sedikit lalu diaduk hingga larut kemudian dimasukkan kedalam labu ukur lalu ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak air mengkudu Jawa Barat 50; 45; 35; 10; dan 5 $\mu\text{g/mL}$ , konsentrasi ekstrak air mengkudu Jawa Timur 50; 45; 35; 15; dan 5 $\mu\text{g/mL}$ dan konsentrasi ekstrak air mengkudu Jawa Tengah 50; 45; 20; 10; dan 5 $\mu\text{g/mL}$ .

#### C. Pengujian Larutan Perbandingan Dengan Standar Asam Askorbat

Timbang sebanyak 1 mg asam askorbat dan dilarutkan dengan metanol dalam labu takar 100 mL, lalu ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas, dikocok hingga homogen. Pembuatan seri konsentrasi asam askorbat (0,1; 0,5; 1; 3 dan 4  $\mu\text{g/mL}$ ).

Penentuan absorbansi dengan cara masing-masing dari konsentrasi asam askorbat dipipet 1,5 mL kemudian didiamkan selama 30 menit dan diamati absorbansi yang terjadi pada masing-masing konsentrasi.

#### D. Penetapan Aktivitas Antioksidan

Larutan seri ekstrak air mengkudu masing-masing dipipet 1,5 mL lalu ditambahkan larutan DPPH 50  $\mu\text{g/mL}$  sebanyak 1,5 mL kemudian didiamkan selama 30 menit dan diamati absorbansi yang terjadi pada masing-masing konsentrasi pada panjang gelombang optimumnya.

E. Penentuan IC<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> dihitung dengan cara memasukkan nilai 50 kedalam persamaan linier sebagai y, kemudian dihitung nilai x. Hasil yang diperoleh merupakan konsentrasi IC<sub>50</sub> (Kristina, 2018).

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

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