

BAB III

TATA KERJA

3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat sokhlet, alat-alat gelas, botol vial, kertas saring, *rotary evaporator* (IKA® RV10 Digital V), cawan porselen, oven, tanur (Branstead® Thermolyne), penjepit kayu, neraca analitik (Ohaus), rak tabung, plat tetes, spektrofotometer UV-Vis, mikropipet, spatel, lemari pendingin, dan seperangkat alat kromatografi lapis tipis.

3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kabau, etanol 96%, akuades, KOH (Merck), Mg (Merck), HCl (Merck), ammonia (Merck), kloroform (Merck), pereaksi *Dragendorf*, 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 (Merck), etil asetat (Merck), plat KLT, pereaksi *folin-ciocalteu* (Merck), sitosterol, β-karoten, DPPH (Sigma-Aldrich), quersetin (Sigma-Aldrich), dan AlCl₃ (Merck).

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Pengumpulan Bahan

Bahan penelitian berupa biji dan kulit kabau yang diperoleh dari Provinsi Lampung.

3.3.2 Determinasi Tumbuhan

Determinasi dilakukan di Laboratorium Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi, Herbarium Bogoriense, LIPI Bogor.

3.3.3 Pemeriksaan Karakteristik Simplisia

Pemeriksaan karakteristik simplisia yang dilakukan meliputi kadar air, kadar abu, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol dan susut pengeringan (Farmakope Herbal Indonesia, 2010).

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 dimasukkan 5 gram serbuk simplisia, lalu ditambahkan 200 mL toluen jenuh air ke dalam labu yang telah berisi sampel uji, kemudian dididihkan. Penyulingan pada awal dilakukan dengan kecepatan kurang dari 2 tetes perdetik, kemudian dinaikkan 4 tetes perdetik. Penyulingan dihentikan setelah seluruh air tersuling, maka dilakukan penyulingan kembali selama 5 menit. Pada tabung penerima setelah memisah air dan toluen, maka dilakukan perhitungan kadar air dengan cara menghitung volume air terhadap bobot kering simplisia (DepKes RI, 1979).

B. Penentuan Kadar Abu Total

Penetapan kadar abu merupakan metode pengukuran terhadap bahan yang dipanaskan pada suhu 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). 2 gram simplisia ditimbang kemudian digerus, dimasukkan ke dalam cawan krus. Arang dipijarkan hingga habis, didinginkan dan ditimbang. Jika

arangnya tidak dapat menghilang, maka abu dipanaskan dalam larutan air panas, kemudian disaring menggunakan kertas saring bebas abu. Kertas saring dan sisa abu dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan, dan dipijarkan hingga bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (DepKes RI, 1979) kemudian dilakukan kadar abu larut asam dan kadar abu tidak larut asam.

C. Penentuan Kadar Sari Larut Air

Penetapan kadar sari larut air bertujuan untuk mengetahui kadar sari dari bahan yang terlarut di dalam pelarut air. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 5 gram, kemudian dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air-kloroform, didalam labu tersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Filtrat disaring, kemudian di ambil 20 mL fitrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal yang telah ditara, dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen sari yang larut dalam air terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (DepKes RI, 1979).

D. Penentuan Kadar Sari Larut Etanol

Penetapan kadar sari larut etanol bertujuan untuk mengetahui kadar sari dari bahan yang terlarut di dalam pelarut etanol. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 5 gram, kemudian dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 95%, didalam labu tersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Filtrat disaring, kemudian diambil 20 mL fitrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal yang telah ditara, dipanaskan pada suhu 105°C

hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen sari yang larut dalam etanol terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (DepKes RI, 1979).

E. Susut Pengerinan

Susut pengerinan bertujuan untuk memberikan batasan maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengerinan, kecuali dinyatakan lain, suhu penetapan adalah 105°C. 1 gram sampai 2 gram zat ditimbang dalam botol timbangan dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu penetapan selama 30 menit dan telah ditara. Bahan diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm sampai 10 mm, dimasukkan ke dalam ruang pengerin, buka tutupnya, dikeringkan pada suhu penetapan hingga bobot tetap (DepKes RI, 2000).

3.3.4 Ekstraksi Bertingkat

Serbuk simplisia biji ditimbang sebanyak 1349,32 gram dan simplisia kulit sebanyak 350 gram, kemudian diekstraksi dengan cara ekstraksi bertingkat dengan metode sokhletasi. Pelarut yang digunakan adalah pelarut dengan kepolaran makin meningkat yaitu n-heksana, etil asetat, dan etanol 96%, masing-masing pelarut yang digunakan 4,5 liter untuk biji dan 4 liter untuk kulit. Serbuk simplisia dibungkus dengan kertas saring, kemudian diekstraksi dengan pelarut n-heksana 4,5 liter untuk biji dan 4 liter untuk kulit sampai pelarut berwarna bening dengan suhu 40°C -50°C selama 4-5 jam. Hasil filtrat yang diperoleh dikentalkan menggunakan *rotary evaporator*. Ampas dikeluarkan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Ampas yang telah dikeringkan selanjutnya diekstraksi dengan pelarut etil asetat 4,5 liter untuk biji dan 4 liter untuk kulit sampai pelarut berwarna bening dengan suhu 40°C -50°C selama 4-5 jam. Hasil filtrat yang diperoleh dikentalkan menggunakan *rotary evaporator*, ampas dikeluarkan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Ampas yang telah dikeringkan selanjutnya diekstraksi dengan

pelarut etanol 96% 4,5 liter untuk biji dan 4 liter untuk kulit sampai pelarut berwarna bening dengan suhu 40°C -50°C selama 4-5 jam. Hasil filtrat yang diperoleh dikentalkan menggunakan *rotary evaporator*. Selanjutnya cawan penguap, ekstrak diuapkan pada suhu kamar, sehingga dipeloreh ekstrak kental, ekstrak ditimbang, kemudian ditentukan nilai rendemennya.

Rendemmen ekstrak ditetapkan dengan rumus:

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

(Novianti, 2016).

3.3.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, fenolat, triterpenoid, stereroid, kuinon, saponin, monoterpen, dan seskuiterpen. Adapun langkah kerjanya sebagai berikut:

A. Alkaloid

Sejumlah simplisia biji kabau dalam mortir, dibasahkan dengan amonia sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan kloroform dan gerus kuat. Cairan kloroform disaring, filtrat ditempatkan dalam tabung reaksi dan tambahkan HCl 2 N. Campuran dikocok, lalu biarkan hingga terjadi pemisahan. Dalam tabung reaksi terpisah:

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

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

Filtrat 3: sebagai blangko atau kontrol negatif (DepKes RI, 1995).

B. Flavonoid

Sejumlah simplisia biji kabau masing-masing digerus dalam mortir dengan sedikit air. Kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan sedikit Mg dan 5 tetes HCl 2 N.

Seluruh campuran dipanaskan selama 5-10 menit. Filtrat 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, 1995).

C. Tanin

Sebanyak 1 gram simplisia biji kabau 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 (DepKes RI, 1995).

D. Fenolat

Sebanyak 1 gram simplisia biji kabau masing-masing ditambahkan 100 mL air air panas, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Pereaksi FeCl_3 ditambahkan, timbul warna hijau biru kehitaman menunjukkan adanya fenol (DepKes RI, 1995).

E. Triterpenoid dan Steroid

Serbuk simplisia biji kabau 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 (DepKes RI, 1995).

F. Kuinon

Serbuk simplisia biji kabau masing-masing ditambahkan air, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring dengan kapas. Filtrat ditambahkan larutan KOH. Terjadi warna merah menunjukkan adanya senyawa kuinon (DepKes RI, 1995).

G. Saponin

Serbuk simplisia biji kabau masing-masing 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 (DepKes RI, 1995).

H. Monoterpen dan Sesquiterpen

Serbuk simplisia biji kabau 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, 1995).

3.3.6 Kromatografi Lapis Tipis

Masing-masing ekstrak biji dan kulit kabau ditotolkan pada lempeng silika gel, dengan jarak 1 cm dari tepi bawah dan 0,5 cm dari tepi samping. Lempeng KLT dielusi dengan larutan pengembang yang sesuai, kemudian diamati menggunakan lampu ultra violet dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm, dan di analisis menggunakan pereaksi penampak bercak yaitu FeCl_3 , liberman burchard, AlCl_3 , asam sulfat 10% dalam metanol, dan DPPH 5%.

3.3.7 Penentuan Kadar Total Fenol dengan Reagen Fenol FolinCiocalteu

A. Pembuatan Larutan Induk Asam Galat

Asam galat ditimbang sebanyak 10 mg kemudian ditambah metanol p.a 20 mL dalam *beaker glass* aduk hingga homogen dimasukkan dalam labu ukur 50 mL. Selanjutnya ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas, lalu dikocok hingga homogen.

B. Pembuatan Larutan Seri Konsentrasi

Dari larutan induk asam galat konsentrasi 100 bpj dipipet 1 mL, 2 mL, 4 mL, 5 mL dan 6 mL, secara berturut turut lalu diencerkan dengan metanol p.a sampai volume akhir 10 mL sehingga dihasilkan konsentrasi 20, 40, 80, 100, dan 120 bpj asam galat, secara berturut-turut.

C. Pembuatan Kurva Standar Asam Galat

Dari masing-masing konsentrasi larutan asam galat dipipet 0,5 mL lalu ditambah 5 mL Reagen *folin-ciocalteu* (yang telah

diencerkan dengan akuades 1:10) dan 4 mL ditambahkan Na_2CO_3 1 M lalu dikocok homogen, dan selanjutnya didiamkan selama 15 menit pada suhu kamar. Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang telah termodifikasi pada panjang gelombang 740 nm, lalu dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat ($\mu\text{g/mL}$) dengan serapan (Pourmorad, 2006).

D. Penetapan Kadar Total Fenol Ekstrak dengan Metode *Folin-Ciocalteu*

Masing-masing ekstrak dilarutkan dalam metanol p.a kemudian diambil 0,5 mL, ditambahkan 5 mL reagen *folin-ciocalteu* (yang telah diencerkan dengan akuades 1:10), dan ditambahkan 4 mL Na_2CO_3 1M lalu dikocok homogen, dan selanjutnya didiamkan selama 15 menit pada suhu kamar. Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang telah termodifikasi pada panjang gelombang 740 nm (Pourmorad, 2006). Pengukuran dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali sehingga kadar fenol yang diperoleh hasilnya dihitung menggunakan regresi linear dari kurva kalibrasi asam galat dan dinyatakan sebagai asam galat ekuivalen per 100 gram ekstrak (g GAE/100 g).

3.3.8 Analisis Kuantitatif Flavonoid Total Biji Kabau Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

A. Pembuatan Kurva Kalibrasi Kuersetin

Larutan baku dibuat dengan menimbang 1 mg kuersetin, dilarutkan dengan metanol sampai 25 mL. Satu seri konsentrasi larutan kuersetin dalam etanol dibuat dari larutan baku, yaitu dengan konsentrasi: 50, 40, 30, 25, 15 bpj. Kemudian masing-masing dipipet 0,5 mL dilarutkan 1,5 mL etanol ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10% ditambahkan 0,1 mL potassium asetat 1 M ditambahkan 2,8 mL akuades, didiamkan 15 menit. Pengukuran absorbansi menggunakan

spektrofotometer UV-Vis yang telah termodifikasi pada panjang gelombang 429 nm. Dari data ini persamaan regresi antara konsentrasi kuersetin dengan serapan dibuat (Chang dkk., 2002).

B. Penentuan Kadar Flavonoid Total

Penentuan kadar flavonoid total dilakukan dengan spektrofotometri menggunakan reagen alumunium klorida sesuai prosedur Chang dkk., (2002). Sebanyak 0,5 mL larutan ekstrak dengan konsentrasi 1000 bpj, ditambah dengan 1,5 mL metanol, 0,1 mL alumunium (III) klorida 10% 0,1 mL, 0,1 mL Natrium asetat 1 M, dan 2,8 mL akuades. Selanjutnya diinkubasi selama 15 menit. Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang telah termodifikasi pada panjang gelombang 429 nm. Kadar flavonoid total dihitung menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi kuersetin dan dihitung sebagai kuersetin ekuivalen per 100 gram ekstrak (g QE/100g).

3.3.9 Penetapan Kadar Total Steroid

A. Penyiapan Larutan Baku Sitosterol

Sitosterol dibuat konsentrasi 500 bpj dengan ditimbang 50 mg kemudian dilarutkan dalam metanol hingga larut, kemudian larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

B. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan baku standar ditambahkan pereaksi besi (III) klorida dan Kalium Heksasianoferrat kemudian diukur serapannya pada berbagai panjang gelombang, kemudian yang memiliki serapan tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum.

C. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Larutan baku standar dibuat berbagai konsentrasi dan ditentukan serapannya (absorbansi). kemudian dibuat kurva kalibrasi sehingga

didapat persamaan kurva kalibrasi antara absorbansi terhadap konsentrasi.

D. Penetapan Kadar Steroid Total

Larutan sampel diambil dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL. Larutan ditambahkan dengan 2 mL asam sulfat 4 N dan 2 ml besi (III) 0.5%. Campuran dipanaskan pada suhu 70°C selama 30 menit dengan penggojogan dan diencerkan sampai tanda batas dengan akuades. Absorbansi diukur sebanyak 3 kali (triplo) dengan panjang gelombang maksimum terhadap reagen blanko sitosterol. Plot hubungan antara konsentrasi (bpj) dengan absorbansinya dibuat (kurva kalibrasi). Kemudian dihitung kadar steroid.

3.3.10 Penetapan Kadar Karotenoid

A. Penyiapan Larutan Baku β -karoten

Sebanyak β -karoten ditimbang dan dilarutkan dalam metanol sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar β -karoten konsentrasi. Kemudian dibuat seri konsentrasi larutan standar β -karoten 10, 15, 20, 25, dan 35 bpj. Salah satu konsentrasi larutan baku dipilih, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 477 nm. Masing-masing konsentrasi diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.

B. Penetapan Kadar Karotenoid Total

Sampel uji dilarutkan dengan n-heksan. Sebanyak 2 mL sampel uji diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum 477 nm sebanyak tiga kali.

3.3.11 Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Penetapan IC_{50}

Pengujian aktivitas antioksidan dan penetapan IC_{50} ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) secara spektrofotometri UV-Vis (Blois, 1958).

A. Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH dibuat dengan konsentrasi 50 bpj. DPPH ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan metanol p.a

hingga 100 mL, kemudian diukur panjang gelombang serapan maksimum 500-700 nm.

B. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak

Larutan induk dibuat dengan cara ditimbang ekstrak dimasukkan dalam gelas kimia kemudian ditambahkan methanol p.a sedikit lalu diaduk hingga larut kemudian dimasukkan kedalam labu ukur lalu ditambahkan methanol p.a sampai tanda batas, dikocok hingga homogen. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak biji dan kulit kabau.

C. Pembuatan Larutan Asam Askorbat

Asam askorbat ditimbang dan dilarutkan dengan metanol dalam labu takar, lalu ditambahkan methanol p.a sampai tanda batas, dikocok hingga homogen. Pembuatan seri konsentrasi asam askorbat (0,1; 0,5; 1; 3; dan 4 bpj).

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. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Larutan seri ekstrak biji kabau masing-masing dipipet 1,5 mL lalu ditambahkan larutan DPPH 50 bpj sebanyak 1,5 mL kemudian didiamkan selama 30 menit dan diamati absorbansi yang terjadi pada masing-masing konsentrasi pada panjang gelombang optimumnya.

E. Penentuan Presentase Peredaman

Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung presentase peredaman DPPH dan membuat kurva kalibrasi dengan presentase peredaman DPPH sebagai sumbu y dan konsentrasi sampel uji/pembanding sebagai sumbu x, sehingga diperoleh persamaan regresi linier. IC_{50} dihitung dengan memasukkan nilai 50 kedalam persamaan linier sebagai y,

kemudian dihitung x . Hasil yang diperoleh merupakan konsentrasi IC_{50} .