

Bab V Prosedur Kerja

V. 1 Penyiapan Bahan

Penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan, determinasi tumbuhan dan pembuatan simplisia.

V. 1. 1 Pengumpulan bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan korteks faloak diperoleh dari Desa Bolok, Kupang, Nusa Tenggara Timur.

V. 1. 2 Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor.

V. 1. 3 Pembuatan Simplisia

Benda asing dan bagian tumbuhan yang tidak digunakan dipisahkan dari daun dan korteks faloak. Daun dan korteks faloak dicuci bersih dengan air mengalir, dirajang, lalu dikeringkan menggunakan oven dengan suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$. Simplisia daun dan korteks faloak kemudian diserbukkan dan disimpan dalam wadah tertutup rapat.

V. 2 Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi simplisia meliputi, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, dan penetapan susut pengeringan.

V. 2. 1 Penetapan Kadar Abu Total

Ditimbang secara seksama 2 sampai 3 gram bahan yang telah dihaluskan dan dimasukkan kedalam krus silikat yang telah dipijar dan ditara, kemudian dipijarkan perlahan hingga arang habis, didinginkan dan ditimbang. Jika masih terdapat arang, tambahkan air panas, aduk dan

disaring menggunakan kertas saring bebas abu. Pijarkan kertas saring beserta sisa penyaringan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan kedalam krus, diuapkan dan dipijarkan hingga bobot tetap. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Kemenkes RI, 2013).

$$\text{kadar abu total} = \frac{\text{Berat abu sisa pijar}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

V. 2. 2 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer LP selama 5 menit. Bagian yang tidak larut asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan dengan krus hingga bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam %b/b (Kemenkes RI, 2013).

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{Berat abu sisa pijar}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

V. 2. 3 Penetapan Kadar Sari Larut Air

Ditimbang seksama lebih kurang 5 gram serbuk yang telah dikeringkan di udara. Dimasukkan kedalam labu bersumbat, ditambahkan 100 mL air jenuh kloroform, dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama, dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring, 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah dipanaskan 105°C dan ditara, panaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut air dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam %b/b (Kemenkes RI, 2013).

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{Berat ekstrak} \times 5}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

V. 2. 4 Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Ditimbang seksama lebih kurang 5 gram serbuk yang telah dikeringkan di udara. Dimasukkan kedalam labu bersumbat, ditambahkan 100 mL etanol P, dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama, dibiarkan selama 18 jam. Selanjutnya disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol, 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah dipanaskan 105°C dan ditara, panaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut etanol dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam %b/b (Kemenkes RI, 2013).

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{Berat ekstrak} \times 5}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

V. 2. 5 Penetapan Susut Pengeringan

Susut pengeringan adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan dengan cara yang telah ditetapkan. Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan menggunakan *moisture balance*. Serbuk simplisia 1-2 g dimasukan ke dalam alat *moisture balance* lalu diatur suhunya 105°C didalam selama kurang lebih 10 menit (Agoes, 2012).

V. 3 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam simplisia daun dan korteks falloak. Penapisan fitokimia meliputi pemeriksaan golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tanin, dan steroid/triterpenoid.

V. 3. 1 Alkaloid

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia dilembabkan dengan amonia 25% sebanyak 5 mL, lalu digerus dalam mortar. Kemudian ditambahkan kloroform sebanyak 20 mL dan digerus kuat-kuat. Campuran kemudian

disaring dan filtrat hasil penyaringan digunakan untuk pengujian (larutan A). Larutan A diteteskan pada kertas saring kemudian ditambahkan pereaksi Dragendorff. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna merah atau jingga pada kertas saring. Larutan A diekstraksi 2 kali dengan larutan HCl 10% (larutan B). Larutan B sebanyak 5 mL dalam tabung reaksi diuji dengan menambahkan pereaksi Mayer dan Dragendorff. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna merah bata pada penambahan pereaksi Dragendorff dan endapan putih pada penambahan pereaksi Mayer (Farnsworth, 1966).

V. 3. 2 Flavonoid

Sebanyak 1 gram sampel dididihkan dalam 100 mL air panas selama 5 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk penapisan senyawa golongan flavonoid, saponin dan kuinon, disebut larutan C. Ke dalam 5 mL larutan C ditambahkan serbuk magnesium dan 2 mL asam klorida-etanol (1:1), kemudian dikocok dengan 10 mL amil alkohol. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga, kuning, atau merah pada lapisan amil alkohol (Farnsworth, 1966).

V. 3. 3 Saponin

Sebanyak 10 mL larutan C dalam tabung reaksi dikocok secara vertikal selama 10 detik dan didiamkan. Pengamatan dilakukan terhadap busa yang terbentuk. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil setelah penambahan 1 tetes asam klorida 2 N (Farnsworth, 1966).

V. 3. 4 Kuinon

Ke dalam 5 mL larutan C ditambahkan beberapa tetes NaOH 1 N. Terbentuknya warna merah menandakan adanya kuinon. Namun dapat

terjadi reaksi positif palsu dengan tanin. Oleh karena itu, pemeriksaan dilanjutkan dengan penambahan gelatin dan endapannya di saring. Kemudian filtrat hasil penyaringan ditambahkan NaOH 1N. Bila tetap terbentuk warna merah maka menunjukkan adanya kuinon (Farnsworth, 1966).

V. 3. 5 Tanin

Sebanyak 5 mL larutan C direaksikan dengan larutan FeCl_3 1 %. Jika terbentuk warna biru kehitaman menunjukkan adanya tanin. Kemudian 5 mL larutan C ditambahkan larutan gelatin 1 %, jika terbentuk endapan putih menunjukkan adanya tanin. Selanjutnya 5 mL larutan C ditambahkan pereaksi Stiasny (formaldehid-asam klorida 1:2) dan dipanaskan dalam tangas air, jika terbentuk endapan merah muda menunjukkan adanya tanin katekat. Endapan disaring, lalu filtrat dijenuhkan dengan natrium asetat dan ditambahkan FeCl_3 1 %. Jika terbentuk warna hitam menunjukkan adanya tanin galat (Farnsworth, 1966).

V. 3. 6 Steroid/ Triterpenoid

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 10 mL larutan eter selama 2 jam, kemudian disaring. Filtrat diuapkan sebanyak 5 mL dalam cawan penguap. Kedalam residu ditambahkan 2 tetes asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Warna merah-ungu menunjukkan positif mengandung triterpenoid, sedangkan warna hijau-biru menunjukkan positif mengandung steroid (Farnsworth, 1966).

V. 4 Ekstraksi

Ekstraksi serbuk daun dan korteks faloak dilakukan dengan cara refluks menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali, masing-masing selama 3 jam. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian

dipekatkan menggunakan *rotary vaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang sehingga diketahui rendemen ekstraknya.

V. 5 Fraksinasi

Fraksinasi ekstrak etanol dilakukan dengan ekstraksi cair-cair (ECC) menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat secara berurutan. Fraksi cair yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental.

V. 6 Pemantauan Ekstrak dan Fraksi

Ekstrak dan fraksi dari daun dan korteks faloak dipantau menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dengan fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak (eluen) yang sesuai, serta penampak bercak AlCl₃ 5% (metanol), anisaldehyd, sitroborat, FeCl₃ 10%, DPPH 0,2% (metanol) dan H₂SO₄ 10% (metanol).

V. 7 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan terhadap ekstrak dan fraksi dari daun dan korteks faloak menggunakan DPPH (1,1-diphenil-2-pikrilhidrazil) secara spektrofotometri (Blois, 1958).

Sampel dan standar dilarutkan dalam metanol ditambahkan larutan stok DPPH (perbandingan 1:1) dan diinkubasi selama 30 menit, pada suhu kamar menggunakan wadah gelap yang dilapisi alumunium foil pada keadaan tertutup. Serapan diukur pada λ maksimal DPPH yang didapat. Persen penurunan absorbansi DPPH dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Nilai inhibisi konsentrasi 50 (IC_{50}) ditentukan dari hubungan antara persen penurunan absorban DPPH terhadap stok yang diuji. Nilai konsentrasi efektif (%) dihitung dari persamaan regresi yang diperoleh dengan memasukkan nilai peredaman 50% sebagai variabel tak bebasnya (Locatelli, 2009).

V. 8 Penetapan Kadar Senyawa Fenolik Total

Penetapan kadar senyawa fenolat pada ekstrak dan fraksi dari daun dan korteks faloak dianalisis dengan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu. Larutan induk dibuat dengan cara melarutkan sampel dengan metanol p.a, kemudian dibuat dengan beberapa konsentrasi dari larutan induk. Sebanyak 0,5 mL larutan uji ditambahkan 5 mL reagen Folin-Ciocalteu diencerkan terlebih dahulu dengan air (1:10), kemudian diinkubasi selama 5 menit. Setelah 5 menit, ditambah 4 mL natrium karbonat 1M, diinkubasi selama 15 menit. Standar yang digunakan adalah asam galat. Standar mengalami perlakuan yang sama dengan sampel. Sampel dan standar diukur pada λ 765 nm. Kadar fenolat total dinyatakan sebagai mg asam galat ekuivalen per 100 mg ekstrak (g GAE/ 100 g ekstrak) dari kurva kalibrasi yang didapat (Ghasemi dkk., 2009).

V. 9 Penetapan Kadar Senyawa Flavonoid Total

Penetapan kadar flavonoid pada ekstrak dan fraksi dari daun dan korteks faloak dengan cara membuat larutan induk dalam metanol p.a, kemudian dibuat dengan beberapa konsentrasi dari larutan induk. Sebanyak 0,5 mL sampel ditambahkan 1,5 mL metanol, 0,1 mL $AlCl_3$ 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, dan 2,8 mL aquadest. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Visibel dengan panjang gelombang 415 nm. Analisis dilakukan 3 kali

(triplo) untuk masing-masing ekstrak dengan membuat kurva standar kuersetin yang mengalami perlakuan yang sama dengan sampel. Kadar flavonoid total dinyatakan sebagai mg kuersetin ekuivalen per 100 mg ekstrak (g QE/100g ekstrak) dari kurva kalibrasi yang didapat (Chang dkk., 2018).