

BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN

4.1 Alat

Alat yang digunakan diantaranya stamper, gelas kimia, mortir, penangas air, labu ukur, cawan penguap, tabung reaksi, pipet tetes, timbangan analitik, tanur, krus, kaca arloji, batang pengaduk, labu erlenmeyer, *moisture balance* (Denver instrumen IR-30[®]), plat KLT silika gel F₂₅₄, *chamber*, *rotary evaporator* (Buchi Rotavapor R-100[®]), perangkat spektrofotometer UV-Sinar Tampak (Shimadzu UV 1800[®]), lampu ultraviolet λ 254 dan 366 nm.

4.2 Bahan

Bahan yang digunakan diantaranya tujuh jenis daun manga yaitu mangga arumanis, apel, indramayu, kweni, gedong gincu, kiojay, madu yang diperoleh dari daerah Majalengka Jawa barat, etanol 96%, serbuk DPPH, aquadest, metanol, ammonia, kloroform, pereaksi Dragendroff, pereaksi mayer, gelatin, amil alkohol, serbuk magnesium, pereaksi Lieberman-Burchard, natrium sulfat, AlCl₃, FeCl₃, H₂SO₄, plat KLT silika F₂₅₄, HCl.

4.2.1 Pengumpulan Bahan

Proses pengumpulan bahan yang digunakan yaitu tujuh jenis daun mangga (arumanis, apel, indramayu, kweni, gedong gincu, madu, dan kiojay) yang diperoleh dari daerah Majalengka Jawa Barat.

4.2.2 Determinasi Tanaman

Tujuan dari determinasi ialah untuk pemastian kebenaran identitas tumbuhan yang digunakan. Determinasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Padjajaran.

4.2.3 Pembuatan dan Penyiapan Simplisia

Bagian tanaman yang sudah dikumpulkan, lalu dilakukan sortasi basah. Setelah itu, daun mangga dicuci dengan air yang mengalir. Kemudian dilakukan pengeringan dengan cara dioven dengan suhu 50°C selama 12 jam, selanjutnya disortasi kembali agar kotoran atau bahan asing yang masih terdapat pada simplisia kering dapat terpisah, lalu dilakukan penggilingan sampai didapatkan serbuk simplisia, kemudian simplisia disimpan pada wadah yang tertutup.

4.3 Karakterisasi Simplisia

4.3.1 Penetapan Kadar Abu Total

Timbang 2 sampai 3 g bahan masukkan ke dalam krus silikat yang sudah dipijar dan ditara, lalu pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, lalu dinginkan serta timbang. Jika dengan cara ini arang tidak bisa dihilangkan, tambahkan air panas, lalu aduk, dan saring dengan kertas saring bebas abu. Pijarkan kertas saring beserta sisa penyaringan dalam krus yang sama. Kemudian masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan dan pijarkan hingga bobot tetap pada suhu $800 \pm 25^\circ\text{C}$. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan yang uji, dinyatakan dalam %b/b (Kemenkes RI, 2017).

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{bobot krus} + \text{abu sisa pijar} - \text{bobot krus kosong}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

4.3.2 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Didihkan abu yang telah diperoleh dari Penetapan Kadar Abu Total dengan 25 mL asam klorida encer LP selama 5 menit. Kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, lalu saring dengan kertas saring bebas abu, lalu cuci dengan air panas, kemudian pijarkan dalam krus hingga bobot tetap pada suhu $800 \pm 25^\circ\text{C}$. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Kemenkes RI, 2017).

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{bobot krus} + \text{abu sisa pijar} - \text{bobot krus kosong}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

4.3.3 Penetapan Kadar Sari Larut Air

Timbang 5 gram serbuk simplisia, masukkan ke labu bersumbat, lalu tambahkan air jenuh kloroform sebanyak 100 mL, kemudian kocok berkali-kali selama 6 jam pertama, biarkan selama 18 jam. Kemudian saring, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal yang sudah dipanaskan 105°C dan ditara, panaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % sari larut air (Kemenkes RI, 2017).

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{(\text{bobot cawan isi}) - (\text{bobot cawan kosong})}{\text{bobot simplisia}} \times \frac{\text{volume pelarut}}{\text{volume filtrat yang diuapkan}} \times 100\%$$

4.3.4 Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Timbang saksama 5 gram simplisia. Masukkan ke labu bersumbat, kemudian tambahkan 100 mL etanol P, kemudian kocok berkali-kali selama 6 jam pertama, dibiarkan selama 18 jam. Lalu saring dengan cepat untuk menghindari penguapan dari etanol, kemudian uapkan 20 mL filtrat sampai kering dalam cawan yang sudah dipanaskan 105°C dan ditara, panaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % (Kemenkes RI, 2017).

$$\text{Kadar sari larut Etanol} = \frac{(\text{bobot cawan isi}) - (\text{bobot cawan kosong})}{\text{bobot simplisia}} \times \frac{\text{volume pelarut}}{\text{volume filtrat yang diuapkan}} \times 100\%$$

4.3.5 Penetapan Kadar Air

Timbang 1-2 g simplisia, lalu dimasukkan kedalam wadah yang sudah ditara. Kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam, lalu ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang pada selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih 0,25% (Kemenkes RI, 2017).

4.4 Pemantauan Ekstrak

Pemantauan ekstrak dilakukan menggunakan KLT, dengan menotolkan ekstrak menggunakan pipa kapiler pada KLT menggunakan fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak yang sesuai. Lalu di kembangkan dalam bejana yang sudah dijenuhkan dengan eluen. Lalu dilihat di bawah sinar UV λ 254 dan 366. Kemudian disemprotkan penampak bercak spesifik seperti FeCl₃ 10%, AlCl₃ 5%, H₂SO₄ 10%, dan DPPH 0,2%. Adanya aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan adanya warna kuning pada latar belakang ungu dari DPPH.

4.5 Skrining Fitokimia

4.5.1 Uji Alkaloid

Sampel ditimbang sebanyak 2 gram lalu ditambahkan amonia 25% lalu di gerus dalam mortar ditambahkan kloroform 10 mL lalu disaring serta filtrat diteteskan pada kertas saring dan teteskan pereaksi Dragendroff buat hasilnya jika membentuk warna merah atau jingga maka hal tadi memberikan yang akan terjadi yang positif adanya senyawa alkaloid. setelah itu residu larutan diekstraksi (ECC) kembali sebesar 2 kali menggunakan HCl 10% hingga terbentuk lapisan air atau dapat diklaim dengan fraksi asamnya sebanyak 5 mL. Lalu larutan kedalam tabung reaksi diberikan pereaksi meyer hasil positif akan terbentuk endapan warna putih serta bertahan selama 15 menit, sebanyak 5 mL fraksi air dimasukan kedalam tabung reaksi ditambahkan beberapa tetes Dragendroff untuk hasilnya bila positif akan menghasilkan kompleks atau endapan berwarna merah (Farnsworth, 1966).

4.5.2 Uji Flavonoid

Sampel ditimbang seberat 1 gram dipanaskan dalam 100 mL air sampai mendidih selama 5 menit, lalu disaring, 5 mL filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi diberikan serbuk magnesium, 1 mL HCl pekat, dan 10 mL amil alkohol, kemudian diaduk hingga terpisah. Sampel dikatakan mengandung senyawa flavonoid jika pada lapisan amil alkohol menjadi warna merah (Farnsworth, 1966).

4.5.3 Uji Saponin

Sampel ditimbang seberat 1 gram dipanaskan dalam 100 mL air sampai mendidih selama 5 menit kemudian didinginkan hingga diperoleh filtrat, 10 mL filtrat ke tabung reaksi lalu dikocok selama 10 detik. Akan terbentuknya buih selama 10 menit setinggi 1 sampai 10 cm, kemudian ditambahkan 1 tetes HCl 2 N, jika buih tersebut tidak hilang maka dinyatakan positif saponin. (Farnsworth, 1966).

4.5.4 Uji Kuinon

Sampel 1 gram dipanaskan dalam 100 mL air sampai mendidih selama 5 menit, kemudian disaring masukan filtrat ke tabung reaksi dan dimasukan beberapa tetes larutan NaOH 1 N. sampel dikatakan positif mengandung kuinon dilihatkan dengan adanya pembentukan menjadi warna merah (Farnsworth, 1966).

4.5.5 Uji Fenol

Sampel ditimbang seberat 1 gram dipanaskan dalam 100 mL air sampai mendidih selama 5 menit lalu disaring. Masukan filtrat kedalam tabung reaksi lalu tambahkan FeCl_3 1%, terbentuknya hijau kehitaman menandakan adanya senyawa golongan fenol.

4.5.6 Uji Tanin

Sampel ditimbang seberat 1 gram dipanaskan dalam 100 mL air sampai mendidih selama 5 menit lalu disaring, diperoleh filtratnya. Masukan filtrat kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan gelatin terbentuknya hijau kecoklatan atau biru kehitaman menunjukan positif senyawa tanin (Farnsworth, 1966).

4.5.7 Uji Steroid/ Triterpenoid

Timbang sampel 1 gram dimaserasi dalam 20 mL eter selama 2 jam, lalu saring, kemudian 5 mL filtrat diuapkan pada cawan penguap. Lalu tambahkan pereaksi Liebermann-Burchard.

Steroid muncul dalam warna hijau dalam hasil positif, sementara triterpenoid muncul dalam warna merah atau ungu (Farnsworth, 1966).

4.6 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi dengan pelarut etanol 96% perbandingan 1:10. Total pelarut 1000 mL etanol 96% dan 100 gram sampel dengan 3 kali pengulangan yaitu 400 mL, 300 mL, 300 mL pengulangan dilakukan setiap 24 jam lalu diaduk sesekali sampai simplisia terendam. Proses ekstraksi dilakukan 3 kali 24 jam, setiap 24 jam disaring menggunakan kertas saring kemudian ampas simplisia di ekstraksi kembali. Filtrat yang telah didapatkan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50-60°C sampai diperoleh ekstrak kental, rendemen dihitung dengan persamaan :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (gram)}}{\text{Berat simplisia (gram)}} \times 100\%$$

4.7 Pengujian Aktivitas Antioksidan metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan dari sampel diuji menggunakan sistem pendeteksian radikal bebas DPPH yang memberikan absorbansi kuat pada panjang gelombang λ 515-520 nm (Molyneux, 2004). Langkah kerja yang dilakukan pada pengujian kuantitatif metode DPPH meliputi pembuatan larutan stok DPPH, penentuan Panjang gelombang DPPH, pembuatan larutan sampel dan penentuan aktivitas antioksidan.

4.7.1 Pembuatan Larutan Stok DPPH

Dibuat larutan induk dengan konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$, sebanyak 20 mg DPPH ditimbang kemudian dilarutkan menggunakan metanol p.a dalam labu takar 10 mL dan dikocok hingga homogen. Larutan induk disimpan dalam botol gelap dan dilapisi *aluminium foil* bila perlu.

4.7.2 Penentuan Panjang Gelombang DPPH

Penentuan Panjang gelombang maksimum dari larutan baku DPPH dilakukan pada Panjang gelombang λ 515-520 nm. Hasil pengukuran diperoleh Panjang gelombang maksimum adalah λ 515 nm.

4.7.3 Penyiapan Larutan Pembandingan

Sebanyak 25 mg asam askorbat dilarutkan dalam labu ukur 50 ml dan di ad metanol p.a hingga tanda batas, konsentrasi didapat 500 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing diencerkan menjadi 10 ppm,

kemudian masukkan ke dalam labu 10 ml. Kemudian larutan baku asam askorbat dibuat seri konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 dan 10 µg/mL dalam labu ukur 10 ml.

4.7.4 Pembuatan Larutan Sampel Uji

Sampel uji dibuat dalam konsentrasi 500 µg/mL masing-masing sampel dengan menimbang 25 mg sampel lalu dilarutkan menggunakan pelarut metanol p.a pada labu takar 50 mL. kemudian dibuat seri pengenceran konsentrasi sampel.

4.7.5 Penentuan Aktivitas Antioksidan

Masing-masing seri konsentrasi larutan sampel uji diambil 2 mL dan ditambahkan 2 mL larutan stok DPPH (1:1), kemudian diinkubasi selama 30 menit. Kemudian absorbansi diukur dengan Panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan pada prosedur sebelumnya. % inhibisi dihitung dengan absorbansi yang didapatkan dari seri konsentrasi larutan stok sampel uji. Nilai IC₅₀ sampel uji ditentukan setelahnya (Molyneux, 2004).

Persen inhibisi dihitung dengan persamaan :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ ditentukan dengan menggunakan persamaan regresi linear ($y=bx+a$) yang diperoleh dari kurva kalibrasi antara konsentrasi (x) dengan % inhibisi (y).

4.7.6 Analisis Data

Data hasil pengujian aktivitas antioksidan terhadap tujuh jenis daun mangga dengan metode peredaman radikal bebas DPPH menggunakan instrument Spektrofotometer UV-Vis. Kemudian data yang diperoleh dibuat kurva kalibrasi untuk menentukan nilai IC₅₀ dengan menggunakan program *Microsoft excel*.