

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Pengambilan Sampel Simplisia

Pada penelitian ini tanaman yang digunakan adalah brokoli (*Brassica oleracea* L. cv. groups Broccoli) segar yang diperoleh dari pertanian Desa Cibodas, Kecamatan Lembang, Kabupaten Bandung Barat. Determinasi tanaman brokoli dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Bagian tanaman brokoli yang akan diteliti adalah bagian bonggol (tangkai perbungaan) dan daunnya.

4.2. Pengolahan Simplisia

Pada awalnya sebanyak 3 kg bonggol dan 3 kg daun brokoli dikumpulkan, disortasi basah, dicuci kemudian dirajang lalu dilakukan proses pengeringan.

4.3. Pemeriksaan Makroskopik dan Mikroskopik

4.3.1. Pemeriksaan makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap bonggol serta daun brokoli (*Brassica oleracea* L. cv. groups Brokoli) yang masih segar, mencakup bentuk, warna, ukuran, dan bau. (WHO, 2011:11).

4.3.2. Pemeriksaan mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan untuk melihat struktur dan fragmen-fragmen dari bonggol serta daun brokoli. Pemeriksaan struktur daun brokoli

dengan membuat penampang melintang daun untuk melihat stomata, trikoma, epidermis, mesofil (palisade dan spons), berkas pembuluh dan stomata. Irisan tipis daun diletakkan pada kaca objek yang telah ditetaskan reagen, ditutup dengan kaca penutup kemudian diamati dibawah mikroskop. Pemeriksaan struktur bonggol brokoli dengan membuat penampang melintang bonggol untuk melihat epidermis, korteks, dengan berkas pembuluh. Irisan tipis bonggol diletakkan pada kaca objek yang telah ditetaskan dengan reagen, ditutup dengan kaca penutup kemudian diamati dibawah mikroskop. Pemeriksaan simplisia dilakukan untuk melihat fragmen-fragmen pada daun dan bonggol brokoli, dengan melihat rambut penutup, epidermis bawah dengan stomata, sel mesofil (palisade dan spons), berkas pembuluh dan hablur kalsium oksalat. Diamati dengan cara 2-3 tetes reagen tertentu seperti (kloral hidrat, I₂KI, air, Floroglusinol, HCl, dan gliserin) ditetaskan pada kaca objek, ditambahkan simplisia yang akan diamati, ditutup dengan kaca penutup lalu diamati di bawah mikroskop. Untuk floroglusinol sebelum ditutup dengan kaca penutup, dikeringkan terlebih dahulu kemudian ditambahkan HCl (WHO, 2011:11-13).

4.4. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, kuinon, saponin, tanin, polifenolat, monoterpen/seskuiterpen dan steroid/triterpenoid (Farnsworth, 1966:245-268).

4.4.1. Alkaloid

Simplisia dimasukkan ke dalam mortir bersih, ditambahkan 5 ml amoniak 25%, lalu digerus. Ditambahkan CHCl₃ sebanyak 20 ml dan digerus kuat,

filtratnya diambil (larutan A). Sebagian larutan A ada yang dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan HCl 10% v/v sehingga terbentuk menjadi dua fase, diambil fase airnya (larutan B) dan sebagian larutan A diteteskan ke kertas saring lalu ditambahkan pereaksi Dragendorff. Adanya golongan alkaloid ditunjukkan oleh warna merah atau jingga yang terbentuk pada kertas saring. Kemudian larutan B dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi. Pada tabung pertama ditambahkan pereaksi Dragendorff dan tabung kedua ditambahkan pereaksi Mayer. Apabila terbentuk endapan merah bata pada penambahan pereaksi Dragendorff dan terbentuk endapan putih pada penambahan pereaksi Mayer, menunjukkan adanya golongan alkaloid (Farnsworth, 1966:245).

4.4.2. Flavonoid

Simplisia ditimbang sebanyak 1 gram, dimasukkan ke dalam gelas kimia, lalu ditambah air panas sebanyak 100 ml dan dididihkan selama 10 menit. Larutan tersebut disaring dan diambil filtratnya sebagai larutan C (digunakan untuk pemeriksaan flavonoid, saponin, kuinon). Larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml, lalu ditambahkan serbuk Mg, 1 ml HCL pekat, dan amilalkohol, kemudian dikocok kuat sampai terjadi pemisahan. Terbentuknya warna pada lapisan amilalkohol, menunjukkan adanya golongan flavonoid (Farnsworth, 1966:263).

4.4.3. Kuinon

Sebanyak 5 ml larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah beberapa tetes NaOH 1 N. Terbentuknya warna kuning sampai merah, menunjukkan adanya golongan kuinon (Farnsworth, 1966:266).

4.4.4. Saponin

Sebanyak 5 ml larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dikocok selama 10 detik. Apabila setelah 10 menit dibiarkan terbentuk busa 1 cm dan busa tidak hilang setelah ditambahkan beberapa tetes HCl, menunjukkan adanya golongan saponin (Farnsworth, 1966:257).

4.4.5. Tanin

Sebanyak 1 g simplisia pada cawan penguap ditambahkan air panas, lalu dididihkan di atas penangas air selama 15 menit. Setelah 15 menit larutan didinginkan, disaring dan filtratnya diambil, dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi. Pada tabung pertama ditambahkan FeCl_3 1%. Terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan, menunjukkan adanya golongan tanin. Pada tabung kedua ditambahkan larutan gelatin 1%. Terbentuknya endapan putih, menunjukkan adanya golongan tanin. Pada tabung ketiga ditambahkan pereaksi Steasny sebanyak 15 ml, lalu dipanaskan di atas penangas air. Terbentuknya endapan merah muda menunjukkan adanya tanin katekat. Adanya tanin galat diuji dari hasil uji tabung ketiga yang dijenuhkan dengan natrium asetat, lalu ditambahkan dengan FeCl_3 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tanin galat (Farnsworth, 1966:264).

4.4.6. Polifenolat

Pada cawan penguap dimasukkan simplisia lalu ditambahkan dengan air dan dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Ditambahkan larutan pereaksi FeCl_3 kedalam filtrat. Terbentuknya warna hijau atau hijau-biru, merah ungu, biru-hitam hingga hitam menunjukkan adanya golongan fenolat dan timbulnya

endapan coklat menunjukkan adanya golongan polifenolat (Farnsworth, 1966:264).

4.4.7. Monoterpena dan seskuiterpena

Simplisia digerus dengan ditambahkan eter, disaring, dan filtratnya ditempatkan dalam cawan penguap, dibiarkan menguap sampai kering. Kemudian ditambahkan larutan vanilin 10% dalam HCl pekat. Timbulnya warna-warna menunjukkan adanya senyawa monoterpena dan seskuiterpena.

4.4.8. Steroid dan triterpenoid

Simplisia digerus dengan ditambahkan eter, disaring, dan filtratnya ditempatkan dalam cawan penguap, dibiarkan menguap sampai kering. Kemudian ditambahkan larutan pereaksi Liebermann-Burchard. Adanya triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna merah-ungu, sedangkan adanya steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau-biru (Farnsworth, 1966:257).

4.5. Pembuatan ekstrak

Simplisia bonggol serta daun brokoli ditimbang sebanyak 100 gram. Simplisia kemudian dimaserasi berulang dengan etanol 96% selama 3 x 24 jam. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian diuapkan dan dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* tekanan rendah pada suhu 40°C. Ekstrak yang telah di evaporasi dimasukkan ke dalam cawan penguap untuk dipekatkan di atas penangas air hingga diperoleh ekstrak kental (Langi, 2013:4).

4.6. Parameter Standar Simplisia

4.6.1. Organoleptis

Pengerjaannya menggunakan pancaindra untuk mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa. Penilaian dilakukan oleh 5 orang pada waktu yang sama (Depkes, 2000:31).

4.6.2. Penetapan kadar air

Metode yang digunakan adalah metode azeotrof, dengan membilas terlebih dahulu tabung penerima dan kondensor dengan air. Kemudian dilakukan proses penjuhan toluen dengan memasukkan 200 ml toluen dan 2 ml air dimasukkan ke dalam labu destilasi dan dididihkan selama 2 jam. Setelah jenuh dilihat air yang ada pada tabung penerima (n_1). Sebanyak 20 gram simplisia dimasukkan ke dalam labu destilasi yang telah berisi toluen yang sudah dijenuhkan dan ditambahkan batu didih untuk mempercepat proses pemanasan. Jika telah mendidih kecepatan penyulingan diatur 2 tetes/detik hingga sebagian besar air tersuling, kemudian kecepatan dinaikkan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam kondensor dibilas dengan toluen dan destilasi dilanjutkan selama 5 menit kemudian pemanasan dihentikan. Tabung penerima didinginkan pada suhu kamar dan diusahakan tidak ada tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima. Air dan toluen dibiarkan memisah pada tabung penerima, kemudian volume air yang terukur dicatat (n) dan kadar air dihitung dalam persen (%) (Depkes RI, 2000:16).

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{n \text{ (ml)} - n_1 \text{ (ml)}}{\text{Berat simplisia (g)}} \times 100 \% \quad (1)$$

4.6.3. Penetapan susut pengeringan

Oven diatur pada suhu 105⁰C, kemudian cawan penguap dipanaskan pada suhu pemanasan selama 30 menit. Dua gram simplisia ditimbang dimasukkan ke dalam cawan penguap yang sudah ditara dan permukaan ekstrak diratakan. Pengeringan dilakukan pada suhu 105⁰C selama 10 menit, lalu dimasukkan ke dalam desikator hingga suhu dingin dan ditimbang (Depkes RI, 2000:13).

Rumus :

$$\text{Susut Pengeringan} = \frac{\text{Berat simplisia yang dipanaskan}}{\text{Berat simplisia awal}} \times 100 \% \quad (2)$$

4.6.4. Penetapan kadar abu total

Dua gram simplisia yang telah digerus dan ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian diratakan. Dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan lalu ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat hilang, maka ditambahkan air panas kemudian disaring dengan kertas saring bebas abu. Sisa kertas dan kertas saring dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan kedalam krus, diuapkan, dipijarkan hingga bobotnya tetap dan kemudian ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah ditiriskan di udara (WHO, 2011:29).

Rumus :

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{Berat abu (g)}}{\text{Berat bahan awal(g)}} \times 100\% \quad (3)$$

4.6.5. Penetapan kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer P selama 5 menit. Bagian yang tidak larut asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan

hingga bobotnya tetap kemudian ditimbang. Kadar abu tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah ditiriskan di udara (WHO, 2011:29).

Rumus :

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{Berat abu tidak larut asam(g)}}{\text{Berat ekstrak awal(g)}} \times 100\% \quad (4)$$

4.6.6. Penetapan kadar sari larut air

Sejumlah 5 gram sampel, masing-masing dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air-kloroform P menggunakan labu bersumbat sambil sesekali dikocok pada 6 jam pertama, dibiarkan selama 18 jam, disaring. Sebanyak 20 mL filtrat diambil lalu diuapkan hingga kering dalam cawan yang sudah ditara kemudian sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah ditiriskan di udara (WHO, 2011:31).

Rumus :

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{Berat sari larut air(g)}}{\text{Berat bahan awal(g)}} \times \frac{100}{20} \times 100\% \quad (5)$$

4.6.7. Penetapan kadar sari larut etanol

Sejumlah 5 gram sampel, masing-masing dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol (96%) menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok pada 6 jam pertama, dibiarkan selama 18 jam, kemudian disaring dengan cepat untuk menghindari penguapan etanol (96%). Sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal yang berdasar rata yang telah ditara kemudian sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol, dihitung terhadap bahan yang telah ditiriskan di udara (WHO, 2011:31).

Rumus :

$$\text{Kadar sari etanol} = \frac{\text{Berat sari larut etanol (g)}}{\text{Berat bahan awal(g)}} \times \frac{100}{20} \times 100\% \quad (6)$$

4.7. Parameter Standar Ekstrak

4.7.1. Penetapan bobot jenis ekstrak

Alat yang digunakan adalah piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer. Piknometer kosong ditimbang kemudian isi dengan ekstrak lalu ditimbang. Setelah itu ekstrak dilarutkan dengan air lalu di timbang (Depkes RI, 2000:14).

Rumus :

$$\text{Bobot Jenis} = \frac{W3 \text{ (g)} - W1 \text{ (g)}}{W2 \text{ (g)} - W1 \text{ (g)}} \quad (7)$$

Keterangan : W1 = Bobot piknometer kosong
 W2 = Bobot piknometer + air
 W3 = Bobot piknometer + ekstrak

4.8. Pemantauan Ekstrak dengan KLT

Ekstrak etanol 96% bonggol, daun brokoli dan pembanding kuersetin ditotolkan pada plat KLT silika gel dengan pengembang etil asetat:kloroform (8:2) dengan penampak bercak alumunium klorida 10% pada sinar UV 254 dan 366 nm. Kemudian disemprot menggunakan penampak bercak pada plat yang berbeda dengan larutan DPPH 0,2% dalam metanol untuk mengidentifikasi keberadaan dari senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dari ekstrak.

4.9. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Kuersetin sebagai pembanding yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Sebanyak 10 mg kuersetin dilarutkan dalam metanol. Dibuat konsentrasi larutan kuersetin dalam metanol (40, 60, 80, 110, 120, 130 dan 140 $\mu\text{g/mL}$). Setiap konsentrasi diambil 0,5 ml, kemudian ditambahkan dengan 1,5 mL metanol, 0,1 mL aluminium klorida 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M dan 2,8 mL aquadest. Diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 426 nm dengan Spektrofotometer UV-Sinar tampak. Larutan blanko yang digunakan adalah metanol. Pada ekstrak yang diperoleh dilarutkan dengan metanol, pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ kemudian dilakukan cara yang sama dengan kuersetin. Kandungan flavonoid total dinyatakan kesetaraannya dengan pembanding (Chang *et al.*, 2002:179).

4.10. Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode Peredaman Radikal Bebas DPPH

Pengujian DPPH dilakukan dengan penyiapan 4 macam larutan : (Molyneux, 2004:215-218)

1. Larutan DPPH : dibuat 50 $\mu\text{g/ml}$ DPPH dalam metanol
2. Larutan sampel ekstrak : setiap ekstrak dibuat pengenceran dengan konsentrasi 100 - 700 $\mu\text{g/ml}$ dalam metanol.
3. Larutan blanko : metanol
4. Larutan vitamin C : dibuat pengenceran vitamin C dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$ dalam metanol.

Panjang gelombang maksimum DPPH ditetapkan pada rentang 400-600 nm. Larutan uji dibuat dengan mencampurkan larutan DPPH dan sampel (ekstrak) yang memiliki aktivitas antioksidan pada proses pemantauan KLT dengan perbandingan 1:1. Larutan pembanding dibuat dengan mencampurkan larutan vitamin C dan larutan DPPH dengan perbandingan 1:1. Larutan kontrol dibuat dengan mencampurkan metanol dan larutan DPPH dengan perbandingan 1:1 sebagai kontrol positif. Untuk pembanding digunakan vitamin C (Molyneux, 2004:215).

Absorbansi dari ekstrak pada bonggol serta daun brokoli yang diperoleh, dibandingkan dengan absorbansi DPPH sehingga diperoleh % aktivitas antioksidannya. Perhitungan persentase aktivitas antioksidan dapat menggunakan rumus :

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \left| \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right| \times 100\% \quad (8)$$

Nilai IC_{50} adalah konsentrasi yang mampu menghambat 50% aktivitas radikal bebas (Yuhernita dan Juniarti, 2011:49). Nilai IC_{50} ditentukan dari kurva regresi antara persen inhibisi terhadap konsentrasi larutan uji. Dari kurva regresi tersebut didapat persamaan regresi linear ($y=a+bx$). Nilai IC_{50} dihitung dari persamaan regresi yang diperoleh dengan memasukkan nilai IC_{50} pada y sehingga didapat nilai konsentrasi efektifnya.

4.11. Analisis Data

Nilai IC_{50} ekstrak bonggol serta daun brokoli diuji perbedaan rata-rata dengan Uji T Independent menggunakan metode SPSS versi 17. Prosedur Uji T Independent: (Harinaldi, 2005:192-194)

1. Pernyataan Hipotesis awal :

H_0 : Tidak ada perbedaan antara bonggol dan daun brokoli (*Brassica oleracea* L. cv. groups Broccoli).

H_1 : Terdapat perbedaan antara bonggol dan daun brokoli (*Brassica oleracea* L. cv. groups Broccoli).

2. Statistik Uji

Digunakan tingkat kepentingan 0,05.

3. Kriteria Uji

Tolak H_0 Jika $P < \alpha$

Terima H_0 Jika $P > \alpha$

4. Pengambilan Keputusan secara Statistik

Jika terdapat perbedaan bermakna, hasil signifikan maka H_0 ditolak.