

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1 Pengambilan Sampel Tumbuhan

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kentut (*Paederia foetida* L.) yang diperoleh dari desa Cicara, Kecamatan Pasirwangi, Kabupaten Garut. Determinasi daun kentut dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati di Insitut Teknologi Bandung (ITB). Adapun bagian yang digunakan adalah daun.

4.2. Pemeriksaan Makroskopik dan Mikroskopik

Pemeriksaan makroskopik meliputi bentuk dan ukuran daun kentut. Adapun pemeriksaan mikroskopik yaitu sayatan melintang dari daun kentut serta serbuk simplisia daun kentut diamati di bawah mikroskop dengan beberapa tetes kloralhidrat.

4.3 Penetapan Parameter Standar Simplisia dan Ekstrak

4.3.1. Penetapan Parameter Standar Simplisia

Penetapan parameter standar simplisia meliputi organoleptik, susut pengeringan, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol.

a. Organoleptik

Menggunakan pancaindera untuk mendeskripsikan warna, bau dan rasa. Hal ini bertujuan untuk pengenalan awal yang sederhana (Depkes, 2000:31). Pemeriksaan organoleptik ini diuji pada lima orang responden.

b. Penetapan susut pengeringan

Satu sampai dua gram serbuk simplisia ditimbang dan dimasukkan ke dalam cawan penguap yang telah ditara dan telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit. Serbuk simplisia ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Pada saat cawan penguap dikeluarkan dari oven, dimasukkan ke dalam eksikator dan dibiarkan menjadi dingin hingga mencapai suhu kamar (Depkes, 2000:13).

c. Penetapan kadar abu total

Dua sampai tiga gram serbuk simplisia, ditimbang dimasukkan ke dalam krus yang telah dipijarkan dan ditara. Dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, kemudian didinginkan dan ditimbang. Jika arang tidak hilang ditambahkan air panas kemudian saring dengan kertas saring bebas abu. Dipijarkan sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus kemudian diuapkan dan dipijarkan hingga bobot tetap, timbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes, 2000:17).

d. Penetapan kadar abu yang tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 mL asam sulfat encer P selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan kemudian disaring melalui krus kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas dan dipijarkan hingga bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes, 2000:17).

e. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air menggunakan cara destilasi azeotrof. Tabung penerima dan kondensor dibersihkan dengan pencuci asam, kemudian dibilas dengan air lalu dikeringkan dalam lemari pengering. Sebanyak 200 mL toluen dimasukkan ke dalam labu lalu alat dihubungkan, dilakukan penjenuhan toluen dengan ditambahkan air 2 mL. Toluena dituang ke dalam tabung penerima melalui kondensor, lalu labu dipanaskan selama 15 menit. Ke dalam labu kering dimasukkan simplisia sebanyak 20 gram dan diperkirakan mengandung 2 mL air. Setelah toluen mendidih, disuling dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes per detik hingga sebagian air tersuling, kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan menjadi 4 tetes per detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam kondensor dicuci dengan toluen sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang telah disambungkan pada sebuah kawat tembaga yang telah dibilas dengan toluen.

Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit, tabung penerima didinginkan hingga mencapai suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca dan dihitung kadar air dalam persen (Depkes, 2000:16).

f. Penetapan kadar senyawa yang larut dalam air

Sejumlah simplisia dimaserasi untuk mendapatkan ekstrak selama 24 jam dengan 100 mL air:kloroform dengan menggunakan labu tersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama kemudian dibiarkan selama 18 jam. Sebanyak 20 mL filtrat disaring dan diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang telah ditara, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap.

Kadar senyawa larut dalam air dihitung terhadap ekstrak awal dinyatakan dalam persen (%) (Depkes, 2000:31).

g. Penetapan kadar senyawa yang larut dalam etanol

Sejumlah simplisia dimaserasi untuk menghasilkan ekstrak selama 24 jam dengan 100 mL etanol 95%, dengan menggunakan labu tersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama kemudian dibiarkan selama 18 jam. Maserat disaring dengan cepat untuk menghindarkan penguapan etanol, sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang telah ditara, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar senyawa larut dalam etanol (95%) dihitung terhadap ekstrak awal dinyatakan dalam persen (%) (Depkes, 2000:31-32)

4.3.2. Penetapan Parameter Standar Ekstrak

Penetapan parameter standar ekstrak yaitu penetapan bobot jenis. Penetapan bobot jenis menggunakan piknometer bersih yang kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C, dimasukkan ke dalam piknometer. Suhu piknometer yang telah diisi diatur hingga suhu 25°C, kelebihan ekstrak cair dibuang dan ditimbang. Bobot piknometer kosong dikurangkan dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air dalam piknometer pada suhu 25°C (Depkes, 2000:14).

4.4. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya beberapa golongan senyawa yaitu di antaranya senyawa monoterpenoid, seskuiterpenoid, alkaloid, saponin, tannin, kuinon, steroid, triterpenoid dan polifenolat (Farnsworth,1996:247-264).

4.4.1. Penapisan alkaloid

Dilakukan dengan cara sebanyak dua gram serbuk simplisia dimasukan ke dalam tabung reaksi kemudian diasamkan dengan penambahan HCl 2N kemudian disaring. Residu yang diperoleh ditambahkan dengan ammonia 10% kemudian ditambah kloroform dan dikocok kuat. Lapisan kloroform dipipet sambil disaring kemudian ditambahkan HCl 2N lalu dikocok kuat sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan asam dipipet dan dibagi menjadi tiga bagian: tabung pertama ditambahkan pereaksi Mayer dan jika terbentuk endapan putih maka itu positif alkaloid. Tabung kedua ditambahkan pereaksi Dragendroff dan jika terbentuk endapan merah bata menunjukkan positif alkaloid (Farnsworth, 1966:245).

4.4.2. Penapisan polifenolat

Sejumlah simplisia dimasukan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan air dan dipanaskan di penangas air kemudian saring. Dalam filtrat ditambahkan pereaksi FeCl₃ dan bila timbul warna hijau atau biru hijau, merah ungu, biru hitam hingga hitam positif polifenolat dan bila timbul endapan coklat positif polifenolat (Farnsworth,1966:264).

4.4.3. Penapisan flavonoid

Sejumlah simplisia dilarutkan dengan 100 mL air panas, kemudian dididihkan selama 15 menit dan disaring. Filtrat (Larutan X) diambil secukupnya ditambah serbuk Mg, HCl 2N dikocok lalu ditambahkan amil alkohol, kemudian dikocok kuat-kuat setelah itu biarkan memisah atau membentuk lapisan. Bila terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu pada lapisan amil alkohol menunjukkan positif flavonoid (Farnsworth,1966:263).

4.4.4. Penapisan saponin

Sejumlah ekstrak simplisia (larutan X) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kocok vertikal selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 menit. Bila busa terbentuk selama kurang lebih 10 menit dengan ketinggian 1-10 cm dinyatakan positif saponin. Untuk memastikannya dapat ditambahkan HCl 2 N beberapa tetes dan bila busa hilang maka negatif saponin dan jika busa tidak hilang maka positif saponin (Farnsworth,1966:257).

4.4.5. Penapisan kuinon

Sejumlah larutan X diambil kemudian ditambahkan NaOH 5% dan bila terbentuk warna kuning hingga merah menandakan positif kuinon (Farnsworth,1966:266).

4.4.6. Penapisan tanin

Sejumlah larutan x diambil dan dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi. Tabung pertama ditambah FeCl₃ dan bila terbentuk warna hijau, violet atau hitam menandakan positif tanin. Tabung kedua ditambahkan gelatin 1% dan bila terbentuk endapan putih menandakan positif tanin. Tabung ketiga ditambahkan

peraksi Steasny kemudian dipanaskan di penangas jika terbentuk endapan merah muda positif tanin katekat. Adanya tanin galat diuji pada tabung ketiga yang dijenuhkan natrium asetat dan FeCl_3 , terbentuk warna biru tinta menandakan positif tanin galat (Farnsworth,1966:264).

4.4.7 Penapisan monoterpen dan seskuiterpen

Sejumlah simplisia dimasukan ke dalam mortar lalu digerus dengan eter, kemudian saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan vanillin 10% dalam HCl pada cawan penguap. Jika timbul warna-warni positif monoterpen dan seskuiterpen (Depkes,1977:132).

4.4.8. Penapisan triterpenoid dan steroid

Simplisia digerus dengan eter lalu disaring filtrat diuapkan hingga kering ditambahkan pereaksi Liebermann-Buchard. Jika warna merah-ungu positif triterpenoid dan hijau-biru positif steroid (Farnsworth,1966:257).

4.5. Ekstraksi

Dalam penelitian ini ekstrak diperoleh dengan cara dingin yaitu maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Simplisia daun kentut yang telah digiling kemudian ditimbang sebanyak 1 kg dan etanol 95% sebanyak 300 mL kemudian dimasukkan ke dalam maserator, dimaserasi secara berulang selama 3 X 24 jam. Ekstrak kemudian dievaporasi dengan menggunakan *vacum rotary evaporator*, ekstrak yang telah dievaporasi dimasukkan ke dalam cawan penguap untuk dipekatkan di atas *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental (Langi, 2013:4).

4.6 Fraksinasi dan Pemantauan dengan KLT

Sebanyak 40 gram ekstrak kental ditambahkan dengan sedikit etanol kemudian ditambahkan air panas hingga larut. Kemudian diekstraksi cair-cair (ECC) dengan n-heksan 120 mL, diambil fase n-heksan kemudian ditambahkan lagi n-heksan (1;1). Fraksi air ditambahkan etil asetat 120 mL, diambil fase etil asetat kemudian ditambahkan lagi etil asetat (1;1). Fraksi air ditambah etanol 96%. Fraksi-fraksi yang diperoleh yaitu fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi etanol. Semua fraksi serta ekstrak etanol dipantau dengan KLT menggunakan pengembang yang sesuai. Penampak bercak yang digunakan adalah sinar UV 254 dan 366 nm yang kemudian dilakukan penyemprotan awal dengan H₂SO₄ 10% dalam metanol, AlCl₃ dan sitroborat (asam sitrat dan asam borat). Disamping itu digunakan larutan DPPH 0,2% dalam metanol sebagai penampak bercak untuk mengidentifikasi keberadaan dari senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dari ekstrak maupun fraksi.

4.7. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Menggunakan metode alumunium klorida kolorimetri. Kuersetin sebagai pembanding dan digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. 12,5 mg kuersetin dilarutkan dalam metanol 25 mL dengan konsentrasi 500 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran sampai konsentrasinya menjadi 40, 50, 60, 80, 100, 120 dan 160 ppm. Kuersetin ditambahkan dengan 1,5 mL metanol 0,1 mL AlCl₃, 0,1 mL natrium asetat, dan 2,8 mL aquadest. Dilakukan penetapan panjang gelombang maksimum kuersetin pada rentang 400-600 nm. Larutan sampel yaitu berupa ekstrak dan fraksi diambil 0,5 mL kemudian ditambahkan dengan 1,5 mL

metanol, 0,1 mL AlCl₃, 0,1 mL natrium asetat dan 2,8 mL aquadest. Selanjutnya campuran diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan Spektrofotometer UV-VIS. Larutan blanko yang digunakan adalah metanol. Kandungan flavonoid total dinyatakan kesetaraannya dengan pembanding (Chang, dkk,2002:179).

4.8 Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan DPPH

Menurut Molyneux (2004:214,215,218) dalam pengujian dengan DPPH pertama-tama dengan menyiapkan tiga macam larutan yaitu:

1. Larutan DPPH: dengan konsentrasi 50-100 ppm dalam metanol.
2. Larutan Sampel : ekstrak dan fraksi terpilih dibuat dengan pengenceran dengan konsentrasi 5000 ppm dalam metanol dan dilakukan rangkaian pengenceran.
3. Larutan Vitamin C: dibuat larutan vitamin C dengan konsentrasi 500 ppm dalam metanol kemudian dilakukan pengenceran hingga konsentrasi 5, 4, 3, 2, dan 1 ppm dalam metanol.
4. Larutan Blanko : metanol

Larutan uji dibuat dengan mencampurkan larutan DPPH dengan ekstrak dan fraksi daun kentut. Larutan uji dibuat dengan mencampurkan 2 ml larutan sampel dan 2 ml larutan DPPH. Larutan kontrol yang digunakan adalah larutan DPPH (Molyneux, 2004:215)

Penetapan panjang gelombang maksimum DPPH dilakukan pada rentang 400-600 nm. Larutan uji, larutan pembanding dan larutan kontrol dikocok kemudian didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang, lalu diukur serapannya

pada spektrofotometer UV sinar tampak pada panjang gelombang maksimumnya. Kapasitas antioksidan untuk menghambat radikal bebas ditentukan dengan persamaan :

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

Absorbansi kontrol merupakan serapan larutan kontrol sedangkan absorbansi sampel merupakan serapan larutan uji atau larutan pembanding yang diukur serapannya pada spektrofotometer pada panjang gelombang maksimumnya.

Inhibitor concentration 50% (IC₅₀) merupakan suatu parameter untuk menentukan aktivitas antioksidan, berupa konsentrasi substrat yang mampu menghambat 50% aktivitas radikal bebas DPPH (Molyneux, 2004: 214).