

BAB IV

PENELITIAN

4.2 Penyiapan Bahan

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

4.1.1 Pengumpulan Bahan

Sampel tanaman daun Sengkubak (*Pycnarrhena Cauliflora* Diels) diperoleh dari Desa Sebetung Kabupaten Sekadau, Kalimantan Barat.

4.1.2 Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan bertujuan untuk memastikan identitas bahan yang dikumpulkan. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Tanjungpura Pontianak.

4.1.3 Pembuatan Simplisia

Proses pembuatan simplisia meliputi sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering, dan penggilingan simplisia menjadi serbuk, selanjutnya serbuk simplisia disimpan ditempat tertutup baik

4.2 Karakterisasi Simplisia

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

4.2.1 Penetapan Kadar Air

Tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan asam pencuci, dibilasi dengan air dan dikeringkan dalam lemari pengering. Ke dalam labu kering

dimasukkan sejumlah ekstrak yang ditimbang secara seksama, yang diperkirakan mengandung 2 mL sampai 4 mL air. Toluena dimasukkan ke dalam labu lebih kurang 200 mL, kemudian alat dihubungkan. Toluena dituang ke dalam tabung penerima melalui alat pendingin dan labu dipanaskan dengan hati-hati selama 15 menit⁽²⁶⁾.

Penyulingan dilakukan dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, setelah toluena mulai mendidih hingga sebagian air tersuling, kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluena sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan terlebih dahulu dibasahi dengan toluena. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima dibiarkan dingin hingga suhu kamar (25°). Setelah air dan toluena memisah sempurna, volume air yang terdapat pada tabung penerima dapat dibaca dan kadar air dihitung dalam persen⁽²⁷⁾.

4.2.2 Penetapan Kadar Abu Total

Penetapan kadar abu total dilakukan dengan cara menimbang lebih kurang 2 gram bahan, dimasukkan ke dalam cawan krus yang telah dipijarkan dan ditara. Kemudian dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, setelah itu didinginkan dan ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara⁽²⁷⁾.

4.2.3 Penetapan Kadar Abu Larut Air

Penetapan kadar abu larut air dilakukan dengan cara, abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 mL air selama 5 menit,

bagian yang tidak larut dikumpulkan dan disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas dan dipijarkan selama 15 menit pada suhu tidak lebih dari 450°C hingga bobot tetap. Perbedaan bobot sesuai dengan jumlah abu yang larut dalam air. Kadar abu yang larut dalam air dihitung terhadap bahan yang dikeringkan di udara ⁽²⁷⁾.

4.2.4 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Penetapan kadar abu tidak larut asam dilakukan dengan cara, abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 mL HCl encer P selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dan dipijarkan hingga bobot tetap, kemudian ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara ⁽²⁷⁾.

4.2.5 Penetapan Kadar Sari Larut Air

Penetapan kadar sari larut air dilakukan dengan mengeringkan serbuk di udara, kemudian 5 gram serbuk dimaserasi dengan 100 mL air selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Ekstrak disaring dan 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar yang telah ditara, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen sari yang larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara ⁽²⁸⁾.

4.2.6 Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Penetapan kadar sari larut etanol dilakukan dengan mengeringkan serbuk di udara, sejumlah 5 gram serbuk dimaserasi dengan 100 mL etanol (95%) selama

24 jam dengan menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan selanjutnya dibiarkan selama 18 jam. Ekstrak disaring cepat agar menghindari penguapan etanol, 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen sari yang larut dalam etanol (95%) dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara ⁽²⁸⁾.

4.3 Penapisan Fitokimia Simplisia

4.3.1 Pengujian Alkaloid

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia dilembabkan dengan 5 mL ammonia 5% dan digerus dalam mortir, kemudian ditambahkan 20 mL kloroform dan digerus dengan kuat. Campuran tersebut disaring melalui kertas saring dan filtrat berupa larutan organik diambil (sebagai larutan A). Sebagian dari larutan A (10 mL) diekstraksi dengan 10 mL larutan HCl 1:10 dengan pengocokan dalam tabung reaksi, diambil bagian lapisan air (sebagai larutan B). Larutan A ditetaskan beberapa tetes pada kertas saring dan ditetesi dengan pereaksi Dragendorff, terbentuknya warna merah atau jingga pada kertas saring menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Larutan B dibagi dalam dua tabung reaksi, masing-masing ditambahkan pereaksi Dragendorff dan Mayer, terbentuknya endapan merah bata dengan peraksi Dragendorff dan endapan putih dengan pereaksi Mayer menunjukkan adanya senyawa alkaloid ⁽²⁷⁾.

4.3.2 Pengujian Flavonoid

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, disaring melalui kertas saring hingga diperoleh filtrat

yang kemudian digunakan sebagai larutan percobaan. Dimasukkan 5 mL larutan percobaan kedalam tabung reaksi, ditambahkan serbuk atau lempeng magnesium secukupnya, dan ditambahkan 1 mL HCl pekat serta 5 mL amil alkohol, dikocok kuat dan biarkan memisah. Terbentuknya warna pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya senyawa flavonoid ⁽²⁷⁾.

4.3.3 Pengujian Saponin

Sebanyak 10 mL larutan percobaan yang diperoleh dari identifikasi golongan flavonoid dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dikocok selama 10 detik secara vertikal, kemudian dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa yang stabil dalam tabung reaksi menunjukkan adanya senyawa golongan saponin, bila ditambahkan 1 tetes HCl 1% busa tetap stabil ⁽²⁷⁾.

4.3.4 Pengujian Tanin

Terhadap 2 gram serbuk simplisia ditambahkan 100 mL air, dididihkan selama 15 menit, didinginkan dan disaring melalui kertas saring, kemudian filtrat dibagi menjadi 2 bagian. Kedalam filtrat bagian pertama ditambahkan larutan FeCl_3 1%. Terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin. Ke dalam filtrat bagian kedua ditambahkan 15 mL pereaksi Steasny yang terdiri dari formaldehida 30% : HCl pekat (2:1), kemudian dipanaskan diatas tangas air. Terbentuknya endapan merah muda menunjukkan adanya tanin katekat. Endapan yang terbentuk disaring, filtratnya dijenuhkan dengan natrium asetat dan ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl_3 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tanin galat ⁽²⁷⁾.

4.3.5 Pengujian Kuinon

Sebanyak 5 mL larutan percobaan yang diperoleh dari identifikasi flavonoid dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya senyawa golongan kuinon. Jika simplisia atau ekstrak positif tanin, maka pengujian kuinon adalah, sebanyak 2 gram serbuk simplisia dimaserasi dalam HCl 19% selama beberapa jam, kemudian dilarutkan dan dilakukan penyaringan sehingga menghasilkan filtrat. Filtrat dimasukkan kedalam 2 tabung, tabung pertama diekstraksi dengan benzen dan tabung kedua diekstraksi dengan eter-kloroform (2:1) sehingga dihasilkan ekstrak. Ekstrak dari kedua tabung masing-masing diuapkan hingga tersisa sedikit ekstrak, kemudian dikocok dan ditambahkan larutan NaOH 30%. Terbentuknya warna jingga violet menunjukkan adanya senyawa kuinon ⁽²⁷⁾.

4.3.6 Pengujian Steroid

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam, kemudian disaring dan diambil filtratnya. Sebanyak 5 mL dari filtrat tersebut diuapkan dalam cawan penguap hingga diperoleh residu. Ke dalam residu ditambahkan pereaksi Lieberman-Burchard yaitu 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna hijau atau merah menunjukkan adanya senyawa golongan steroid atau triterpenoid ⁽²⁷⁾.

4.4 Penapisan Fitokimia Ekstrak

4.4.1 Pengujian Alkaloid

Ekstrak sampel sebanyak 1-2 mL ditambahkan 2 mL kloroform dan 2 mL amoniak, dikocok dan disaring. Filtrat ditambahkan H₂SO₄ pekat sebanyak

3-5 tetes untuk menetralkan, kemudian dikocok sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan asam yang tidak berwarna selanjutnya dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi, masing-masing tabung ditambahkan pereaksi Mayer dan pereaksi Dragendorff sebanyak 4-5 tetes. Perubahan warna dan terbentuknya endapan berturut-turut berwarna putih keruh dan kuning-merah lembayung menunjukkan positif alkaloid ⁽²⁸⁾.

4.4.2 Pengujian Flavonoid

Ekstrak sampel sebanyak 1-2 mL ditambahkan sedikit serbuk Mg, HCl 2 N, dan etanol sebanyak 4-5 tetes, kemudian dikocok. Perubahan warna menjadi merah, kuning, atau jingga menunjukkan positif flavonoid ⁽²⁸⁾.

4.4.3 Pengujian Tanin

Ekstrak sampel sebanyak 1-2 mL dipanaskan pada penangas air kemudian disaring. Filtrat ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 1%. Perubahan warna ungu atau biru kehitaman menunjukkan positif tanin ⁽²⁸⁾.

4.4.4 Pengujian Saponin

Ekstrak sampel sebanyak 1-2 mL ditambahkan air panas, didinginkan dan dikocok kuat selama 1 menit, kemudian ditambahkan HCl encer dan didiamkan. Jika terbentuk busa atau buih yang stabil selama 1-15 menit, menunjukkan positif saponin ⁽²⁸⁾.

4.5 Ekstraksi

Sebanyak 350 gram serbuk daun sengkubak dimaserasi dengan menggunakan pelarut n-heksan selama 3x24 jam pada suhu kamar dengan pergantian pelarut setiap 24 jam, dan sesekali dilakukan pengocokan. Ekstrak

yang diperoleh dipisahkan dari ampasnya dengan cara disaring, Filtrat n-heksan dikumpulkan lalu dipekatkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental, sedangkan ampasnya dimaserasi kembali dengan pelarut etil asetat. Perlakuan selanjutnya sama seperti n-heksan, dan ampas yang didapat di maserasi kembali dengan pelarut etanol.

4.6 Validasi Metode Analisis

4.6.1 Pembuatan Larutan DPPH 100 ppm

Sebanyak 10 mg DPPH ditimbang secara seksama, dilarutkan dengan etanol PA dalam labu ukur sampai 100 mL, sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 100 ppm.

4.6.2 Penentuan Panjang Gelombang maksimum

Sebanyak 2 mL larutan DPPH 100 ppm ditambahkan 2 mL etanol PA. Larutan dikocok dan diinkubasi selama 30 menit ditempat gelap pada suhu kamar (25°C). Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 200 nm sampai 400 nm.

4.6.3 Pembuatan Larutan Stok Vitamin C 1000 ppm

Menimbang secara seksama vitamin C sebanyak 100 mg kemudian dilarutkan dengan etanol PA dalam labu ukur 100 mL dan ditepatkan volumenya hingga tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan stok tersebut dilakukan pengenceran vitamin C hingga diperoleh konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm.

4.6.4 Uji Linieritas

Uji linieritas ditentukan dengan mengukur absorbansi dari larutan standar vitamin C yang sudah diencerkan pada tahap sebelumnya dengan variasi konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm. Dari masing-masing konsentrasi tersebut diambil sebanyak 2 mL dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH. Larutan kemudian diinkubasi ditempat gelap selama 30 menit dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 518 nm. Hasil pengukuran dibuat kurva yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi terhadap absorbansi, kemudian dilakukan uji regresi linier sederhana dan uji korelasi untuk menghitung koefisien linearnya.

4.6.5 Uji Presisi

Uji presisi dilakukan dengan cara membuat pengenceran larutan standar vitamin C menggunakan etanol PA dengan konsentrasi 6 ppm sebanyak 6 replikasi. Kemudian dari konsentrasi tersebut diambil sebanyak 2 mL dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH 100 ppm. Larutan kemudian diinkubasi ditempat gelap selama 30 menit, selanjutnya diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 518 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh dari seri kadar 6 ppm kemudian dimasukkan kedalam persamaan :

i) Harga konsentrasi rata-rata

Harga konsentrasi rata-rata dihitung melalui persamaan sebagai berikut :

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_n}{n}$$

Keterangan : \bar{X} = Rata-rata konsentrasi

X = Konsentrasi sampel

n = Jumlah sampel

ii) Nilai SD (Standar Deviasi)

Untuk menghitung nilai standar deviasi dapat digunakan persamaan :

$$SD = \frac{n \sum X^2 - (\sum X)^2}{n(n-1)}$$

Keterangan : SD = Standar deviasi

n = Jumlah sampel

X = Konsentrasi sampel

iii) Nilai RSD (Standar Deviasi Relatif)

Nilai standar deviasi relatif dapat diperoleh melalui persamaan :

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

Keterangan : (%) RSD = Persen standar deviasi

SD = Standar deviasi

\bar{X} = Rata-rata konsentrasi

iv) Ketelitian Alat

Ketelitian alat dapat dihitung melalui persamaan :

$$\text{Ketelitian alat} = 100\% - \frac{SD}{\bar{X}}$$

4.6.6 Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan metode penambahan bahan baku 2 ppm pada sampel 4 ppm, kemudian diambil sebanyak 2 mL dari larutan tersebut dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH 100 ppm. Larutan diinkubasi ditempat gelap

selama 30 menit pada suhu kamar, selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 518 nm. Uji akurasi dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Persen perolehan kembali dihitung dengan rumus sebagai berikut :S

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{(C_f - C_A)}{C^* A} \times 100\%$$

Keterangan : C_f = Kadar sampel setelah penambahan larutan baku

C_A = Kadar sampel sebelum penambahan Larutan baku

$C^* A$ = Kadar larutan baku yang ditambahkan

4.6.7 Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi

Batas deteksi deteksi dan batas kuantitasi dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi, yaitu *intercept* kurva dan standar deviasi regresi. Persamaan standar deviasi regresi adalah sebagai berikut :

$$S^{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n-2}}$$

Keterangan : $S^{y/x}$ = Standar deviasi regresi

$\sum (y_i - \hat{y})^2$ = Jumlah nilai $(y_i - \hat{y})^2$

n = Jumlah data pengulangan

Nilai batas deteksi (BD) dapat dihitung dari persamaan :

$$Y_{BD} = 3S^{y/x} + a$$

Nilai batas kuantitasi dapat dihitung dari persamaan :

$$Y_{BD} = 10S^{y/x} + a$$

Y_{BD} merupakan respon batas deteksi dan a merupakan *intercept* kurva kalibrasi. Respon batas deteksi dari persamaan diatas dapat dihitung berdasarkan

persamaan regresi sebagai y , maka diperoleh nilai batas deteksi dan batas kuantifikasi (x)

4.7 Pengujian Aktivitas Antioksidan

4.7.1 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Etanol Daun Sengkubak

Sebanyak 100 mg ekstrak pekat etanol dilarutkan dengan etanol PA dalam labu ukur sampai 100 mL, sehingga diperoleh larutan ekstrak etanol dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan stok dilakukan pengenceran untuk memperoleh larutan dengan konsentrasi 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, dan 400 ppm.

4.7.2 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Etil Asetat Daun Sengkubak

Sebanyak 100 mg ekstrak pekat etil asetat ditambahkan beberapa tetes dimetil sulfoksida (DMSO), kemudian dilarut dengan etanol PA dalam labu ukur sampai 100 mL, sehingga diperoleh larutan ekstrak etil asetat dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan stok dilakukan pengenceran untuk memperoleh larutan dengan konsentrasi 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm, 500 ppm, dan 550 ppm.

4.7.3 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak n-Heksan Daun Sengkubak

Sebanyak 100 mg ekstrak pekat n-heksan ditambahkan beberapa tetes DMSO, kemudian dilarut dengan etanol PA dalam labu ukur sampai 100 mL, sehingga diperoleh larutan ekstrak n-heksan dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan stok dilakukan pengenceran untuk memperoleh larutan dengan konsentrasi 450 ppm, 500 ppm, 550 ppm, 600 ppm, 650 ppm, dan 700 ppm.

4.7.4 Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak

Pengujian aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak dilakukan dengan mengambil sebanyak 2 mL dari masing-masing konsentrasi dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH 100 ppm. Larutan dikocok kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Serapan diukur dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 518 nm. Sebagai kontrol dilakukan pengukuran serapan DPPH pada panjang gelombang yang sama. Setelah diperoleh nilai absorban, kemudian dihitung % peredaman dengan rumus :

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{\text{Absorban kontrol} - \text{Absorban sampel}}{\text{Absorban kontrol}} \times 100\%$$

Dari % peredaman yang diperoleh, ditentukan nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi yang mampu meredam 50% radikal bebas. Nilai IC₅₀ dapat dihitung dari kurva regresi linier antara persen aktivitas penangkapan radikal bebas terhadap konsentrasi ⁽¹⁹⁾.