

## **BAB IV**

### **PENELITIAN**

#### **4.1. Penyiapan Bahan**

Penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan, determinasi dan pengolahan bahan menjadi simplisia.

##### **4.1.1. Pengumpulan Bahan**

Bahan yang diteliti, berupa kulit batang tanaman mangga (*Mangifera indica* L.) yang diperoleh dari daerah karang tengah Kabupaten Garut.

##### **4.1.2. Determinasi**

Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bandung, Sekolah Ilmu Teknologi dan Hayati ITB, untuk memastikan identitas tanaman.

##### **4.1.3. Pengolahan Bahan Baku**

Bahan baku yang telah dikumpulkan dibersihkan dari pengotor, kemudian dicuci dengan menggunakan air yang mengalir. Setelah itu dirajang dan kemudian dikeringkan tanpa terkena sinar matahari langsung agar senyawa tidak rusak, disortasi kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender dan dapat disimpan untuk dapat digunakan.

#### **4.2. Karakterisasi Simplisia**

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

#### 4.2.1. Pemeriksaan Makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap simplisia kulit batang tanaman mangga (*Mangifera indica* L.) secara organoleptik yang meliputi warna, bentuk, ukuran, dan tekstur<sup>(17,18)</sup>.

#### 4.2.2. Pemeriksaan Mikroskopik

Pemeriksaan ini dilakukan pada serbuk kering simplisia. Serbuk tersebut diletakan pada kaca objek dan diberi beberapa tetes klorahidrat 70% dan air gliserin dan diamati dibawah mikroskop. Kulit batang mangga memiliki sklerenkim berkelompok, fragmen serabut sklerenkim, sel parenkim, dan jaringan gabus.

#### 4.2.3. Penetapan Susut Pengerinan

Satu gram bahan ditimbang dalam cawan krus bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105<sup>0</sup>C selama 30 menit dan telah ditara. Kemudian krus yang telah ditara dimasukkan ke dalam oven dengan tutup terbuka dan dikeringkan pada suhu 105<sup>0</sup>C hingga bobot tetap. Sebelum dan setiap pengeringan, kemudian cawan dibiarkan dalam keadaan tertutup dalam desikator hingga suhu kamar (25<sup>0</sup>C)<sup>(17,18)</sup>.

#### 4.2.4. Penetapan Kadar Air

Tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan asam pencuci, dibilas dengan air, dan dikeringkan dalam lemari pengering. Sejumlah ekstrak yang ditimbang saksama yang diperkirakan mengandung 2 mL sampai 4 mL air dimasukkan ke dalam labu kering. Selanjutnya dimasukkan lebih kurang 200 mL toluen ke dalam labu dan alat dihubungkan. Toluene dituangkan

ke dalam tabung penerima (R) melalui alat pendingin. Labu dipanaskan selama 15 menit dengan hati-hati.

Setelah toluen mulai mendidih, air disuling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian air tersuling, kemudian dinaikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluen, dan dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan terlebih dahulu dibasahi dengan toluen. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima dibiarkan dingin hingga suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air yang terdapat di tabung penerima dibaca. Kadar air dihitung dalam persen <sup>(17,18)</sup>.

#### **4.2.5. Penetapan Kadar Sari Larut Air dan Larut Etanol**

Penetapan kadar sari larut air dilakukan dengan mengeringkan serbuk di udara, dan dimaserasi selama 24 jam. Lima gram serbuk simplisia ditambahkan dengan 100 mL air kloroform P pada labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Maserat disaring dan 20 mL maserat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara. Panaskan sisa pada suhu 105<sup>0</sup>C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen sari yang larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara <sup>(17,18)</sup>.

Pada penetapan kadar sari larut etanol dimulai dengan mengeringkan serbuk simplisia di udara dan dimaserasi selama 24 jam. Lima gram serbuk simplisia ditambahkan dengan 100 mL etanol 95% menggunakan labu

bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Maserat di saring cepat untuk menghindari terjadinya penguapan etanol 95%. Filtrat diuapkan sebanyak 20 mL hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, Sisa penguapan dipanaskan pada suhu 105<sup>0</sup>C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen sari yang larut dalam etanol 95%, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara <sup>(17,18)</sup>.

#### **4.2.6. Penetapan Kadar Abu total, Kadar Abu Larut Air dan Kadar Abu Tidak Larut Asam**

Penetapan kadar abu total dilakukan dengan cara, 2 gram bahan yang telah digerus dan ditimbang seksama dimasukkan ke dalam krus platina atau krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara. Bahan dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan, dan ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

Penetapan kadar abu larut air dilakukan dengan cara abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu dididihkan dengan 25 mL air selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dikumpulkan dan disaring menggunakan kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas dan dipijarkan selama 15 menit pada suhu yang tidak lebih dari 450<sup>0</sup>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.

Penetapan kadar abu tidak larut asam dilakukan dengan cara abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu dididihkan dengan 25 mL HCl encer P

selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan dan disaring menggunakan kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dan dipijarkan hingga bobot tetap. kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara <sup>(17,18)</sup>.

### **4.3. Penapisan Fitokimia**

#### **4.3.1. Pengujian Alkaloid**

Dua gram serbuk simplisia dilembabkan dengan 5 mL amonia 30% dan digerus dalam mortir, kemudian ditambah 20 mL kloroform dan digerus dengan kuat. Campuran tersebut disaring dengan kertas saring, filtrat berupa larutan organik diambil (sebagai larutan A). Sebagian dari larutan A (10 mL) diekstraksi dengan 10 mL larutan HCl 1:10 dengan pengocokan tabung reaksi, diambil larutan bagian atasnya (larutan B). Larutan A ditetesi beberapa tetes pada kertas saring dan disemprot atau 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 pereaksi Dragendorff dan endapan putih dengan pereaksi Mayer menunjukkan adanya senyawa alkaloid <sup>(19)</sup>.

#### **4.3.2. Pengujian Flavonoid**

Terhadap 2 gram serbuk simplisia ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, disaring dengan kertas saring hingga diperoleh filtrat yang kemudian digunakan sebagai larutan percobaan. Ke dalam 5 mL larutan percobaan (dalam tabung reaksi) ditambahkan serbuk atau lempeng

magnesium secukupnya dan ditambah 1 mL HCl pekat serta 5 mL amil alkohol, dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Terbentuknya warna pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya senyawa flavonoid <sup>(19)</sup>.

#### **4.3.3. Pengujian Saponin**

Sebanyak 10 mL larutan percobaan yang diperoleh dari identifikasi golongan flavonoid dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok secara vertikal selama 10 detik, kemudian dibiarkan 10 menit. Terbentuknya busa yang stabil dalam tabung reaksi menunjukkan adanya senyawa golongan saponin. Busa tetap stabil bila ditambahkan 1 tetes HCl 1% <sup>(19)</sup>.

#### **4.3.4. Pengujian Tanin**

Ke dalam 2 gram serbuk simplisia ditambahkan 100 mL air, dididihkan selama 15 menit, didinginkan, dan disaring dengan kertas saring, kemudian filtrat dibagi dua bagian. Ke dalam filtrat pertama ditambahkan larutan FeCl<sub>3</sub> 1%. Terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa golongan tanin. Ke dalam filtrat kedua ditambahkan 15 mL pereaksi Steasny (formaldehida 30% : HCl pekat = 2:1), dan dipanaskan di atas penangas air. Terbentuknya endapan merah muda menunjukkan adanya tanin katekat. Selanjutnya endapan disaring, filtrat dijenuhkan dengan natrium asetat, dan ditambahkan beberapa tetes larutan feri (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tanin galat <sup>(19)</sup>.

#### **4.3.5. Pengujian Kuinon**

Sebanyak 5 mL larutan percobaan yang diperoleh dari identifikasi flavonoid, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan beberapa tetes

larutan NaOH 1 N. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya senyawa golongan kuinon.

Jika ekstrak positif tanin, sebanyak 2 gram serbuk simplisia dimaserasi dalam HCl 19% selama beberapa jam kemudian dilarutkan dan dilakukan penyaringan sehingga menghasilkan filtrat. Filtrat dimasukkan ke dalam dua tabung. Tabung 1 diekstraksi dengan benzen dan tabung 2 diekstraksi dengan eter-kloroform (2:1) sehingga dihasilkan ekstrak. Ekstrak kedua tabung masing-masing diuapkan sampai tersisa sedikit ekstrak kemudian dikocok dan ditambahkan larutan NaOH 30%. Hasil positif kuinon terbentuk warna jingga violet<sup>(19)</sup>.

#### **4.3.6. Pengujian Steroid/Triterpenoid**

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan menggunakan 20 mL eter selama 2 jam (dalam wadah dengan penutup rapat), kemudian disaring dan diambil filtratnya. Sebanyak 5 mL dari filtrat tersebut diuapkan dalam cawan penguap hingga diperoleh residu. Ke dalam residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Lieberman-Buchard). Terbentuknya warna hijau atau merah menunjukkan adanya senyawa golongan steroid atau triterpenoid<sup>(19)</sup>.

#### **4.4. Ekstraksi**

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Sebanyak 500 gram kulit batang mangga (*Mangifera indica* L.) dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol selama 3x24 jam pada suhu kamar dengan pergantian pelarut setiap 24 jam. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dari ampasnya dengan cara disaring

menggunakan kertas saring Whatman No.114 dan filtrat dikumpulkan lalu dipisahkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental <sup>(20)</sup>.

#### **4.5. Fraksinasi**

Pemisahan dilakukan dengan memisahkan ekstrak kental etanol yang telah ditambahkan air panas, disaring, dan didinginkan. Kemudian setelah itu diekstraksi cair-cair atau difraksinasi menggunakan pelarut dengan kepolaran yang bertingkat, yaitu dengan n-heksan dan etil asetat. Dengan cara melakukan fraksinasi. Fraksinasi antara ekstrak etanol-air dengan pelarut n-heksan dan ekstrak etanol-air dengan pelarut etil asetat. Sehingga hasil fraksinasi diperoleh fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat. Kemudian masing-masing fraksi dipisahkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh fraksi kental n-heksan dan etil asetat.

#### **4.6. Pemantauan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Pemeriksaan kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan terhadap ekstrak etanol kulit batang mangga (*Mangifera indica* L) dengan menggunakan fase diam silika gel F<sub>254</sub> dan fase gerak n-heksana:etil asetat yang diamati di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm kemudian kromatogram disemprot dengan penampak bercak spesifik dan DPPH.

#### **4.7. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH**

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH meliputi penyimpanan sampel, penyiapan larutan induk/pembanding (Vitamin C), pembuatan larutan DPPH, dan penetapan IC<sub>50</sub> masing-masing sampel.

#### **4.7.1. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM**

Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM dengan ditimbang sebanyak 3,94 mg dilarutkan dalam labu ukur 100 mL dengan etanol hingga tanda batas <sup>(16)</sup>.

#### **4.7.2. Penentuan panjang gelombang maksimum**

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara mengambil 1 mL larutan DPPH 0,1 mM kemudian ditambahkan 2 mL etanol proanalisis. Selanjutnya campuran diinkubasi selama 30 menit ditempat gelap kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm. Panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum.

#### **4.7.3. Pembuatan Larutan Vitamin C sebagai Pembanding**

Pembuatan larutan vitamin C dibuat dengan konsentrasi 1000 µg/mL (Larutan stok) dibuat beberapa konsentrasi dimulai 2, 4, 6, 8, dan 10 µg/mL.

#### **4.7.4. Pembuatan Larutan Uji Dari Ekstrak Etanol, Fraksi Etil Asetat dan Heksan**

Pembuatan larutan uji ekstrak etanol sebanyak 10 mg sampel uji (Ekstrak etanol kulit batang mangga) ditimbang secara seksama, dilarutkan dengan etanol proanalisis lalu dimasukkan dalam labu ukur hingga mencapai volume 100 mL (100 µg/mL). Larutan induk dibuat beberapa konsentrasi dimulai 10, 15, 20, 25, dan 30 µg/mL.

Pembuatan larutan uji fraksi etil asetat sebanyak 50 mg sampel uji (fraksi kulit batang mangga) ditimbang secara seksama, dilarutkan dengan menggunakan etanol proanalisis lalu dimasukkan ke dalam labu ukur hingga mencapai volume 50 mL (50 µg/mL). Larutan induk dibuat beberapa konsentrasi dimulai 30, 35, 40, 45 dan 50 µg/mL.

Pembuatan larutan uji fraksi heksan 30 mg (fraksi kulit batang mangga) ditimbang secara seksama, dilarutkan dengan etanol proanalisis. Larutan induk dibuat beberapa konsentrasi dimulai 300, 330, 360, 390 dan 450 µg/mL.

#### 4.7.5. Penetapan IC<sub>50</sub> dengan Metode DPPH

Sebanyak 1 mL larutan fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan ekstrak etanol kulit batang mangga (*Mangifera indica* L.) dan vitamin C dari berbagai konsentrasi masing-masing ditambahkan 2 mL DPPH 0,1 mM. Sampel dikocok kemudian dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm.

Sebagai kontrol dilakukan dengan pengukuran serapan DPPH pada panjang gelombang yang sama. Setelah diperoleh nilai absorban kemudian dihitung % peredaman dengan rumus :

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

% peredaman diperoleh nilai IC<sub>50</sub> yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 50% radikal bebas. Nilai IC<sub>50</sub> dapat dihitung dari kurva regresi linear antara persen aktivitas penangkapan radikal bebas terhadap konsentrasi.