

## **BAB IV**

### **PENELITIAN**

#### **4.1 Penyiapan Bahan**

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

Pengumpulan bahan yang digunakan diperoleh dari Desa Mijen, Kecamatan Mijen, Kabupaten Demak, Jawa Tengah.

##### **4.1.2 Determinasi**

Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung.

##### **4.1.3 Pembuatan Serbuk**

Pembuatan simplisia dilakukan melalui beberapa proses. Setelah daun putri malu terkumpul, kemudian dilakukan sortasi basah, pencucian, pengeringan, sortasi kering, dan penggilingan simplisia menjadi serbuk. Simpan serbuk simplisia dalam wadah kering, bersih, dan tertutup rapat<sup>(18)</sup>.

#### **4.2 Pemeriksaan Karakterisasi Simplisia**

##### **4.1.1 Penetapan Makroskopik**

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap daun putri malu (*Mimosa pudica* L.) yang meliputi ukuran, bau, rasa, dan warna.

##### **4.1.2 Penetapan Mikroskopik**

Pemeriksaan mikroskopik daun dilakukan menggunakan serbuk simplisia daun putri malu.

#### **4.1.3 Penetapan Kadar Air**

Tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan asam pencuci, dibilas dengan air, dan dikeringkan dalam lemari pengering. Ditimbang sejumlah bahan yang diperkirakan mengandung 1-4 mL air lalu dimasukkan ke dalam labu bulat kering. Toluena dimasukkan lebih kurang 200 mL ke dalam labu, kemudian rangkaian alat dipasang. Toluena jenuh air dimasukkan ke dalam tabung penerima melalui pendingin sampai leher alat penampung. Labu dipanaskan dengan hati-hati selama 15 menit.

Setelah toluena mendidih, disuling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian dinaikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, cuci bagian dalam pendingin dengan toluena, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan sudah dibasahi toluena lalu dilanjutkan pengeringan selama 5 menit. Tabung penerima dibiarkan sampai dingin pada suhu kamar dan diusahakan tidak ada tetesan air yang melekat pada dinding tabung penerima. Setelah air dan toluena memisah sempurna, lalu volume dibaca. Kadar air dihitung dalam persen<sup>(19)</sup>.

#### **4.1.4 Penetapan Abu Total**

Sebanyak 3 gram serbuk kering simplisia dimasukkan ke dalam krus platina atau krus silikat yang telah diketahui bobotnya. Kemudian diratakan dan dipijarkan perlahan-lahan hingga arangnya habis, lalu didinginkan dan ditimbang. Apabila dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, maka ditambahkan air panas dan disaring melalui kertas saring bebas abu.

Kemudian dipijarkan sisa abu dan kertas saring dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus dan diuapkan, dipijarkan hingga bobot tetap lalu ditimbang. Kadar abu total dinyatakan dalam persen<sup>(19)</sup>.

#### **4.1.5 Penetapan Kadar Abu Larut Air**

Abu yang yang diperoleh dari penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 mL air selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dikumpulkan dan disaring melalui kertas saring bebas abu kemudian dicuci dengan air panas. Residu dan kertas saring bebas abu kemudian dipijarkan selama 15 menit pada suhu 400°C sampai bobot tetap. Perbedaan bobot sesuai dengan jumlah abu yang larut air. Kadar abu yang larut dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara<sup>(20)</sup>.

#### **4.2.5 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam**

Abu yang telah diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit, kemudian bagian yang tidak larut asam dikumpulkan, disaring, melalui kertas saring bebas abu, dipijarkan hingga bobot tetap, kemudian ditimbang kadar abu yang tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara<sup>(19)</sup>.

#### **4.2.6 Penetapan Kadar Sari Larut Air**

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia yang telah dikeringkan di udara dimasukkan ke dalam labu bersumbat lalu ditambahkan 100 mL air jenuh kloroform. Dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian ekstrak disaring dan 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dan cawan dangkal beralas datar yang telah

dipanaskan pada suhu 105°C dan ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen sari larut air<sup>(19)</sup>.

#### **4.2.7 Penetapan Susut Pengeringan**

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia ditimbang dalam cawan krus tertutup yang sebelumnya telah ditara pada suhu 105°C selama 30 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam oven untuk dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan, cawan dibiarkan dalam keadaan tertutup sampai dingin dalam desikator hingga suhu kamar<sup>(19)</sup>.

#### **4.2.8 Penetapan Kadar Sari Larut Etanol**

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia yang telah dikeringkan di udara dimasukkan ke dalam labu bersumbat, ditambahkan 100 mL etanol 96%, dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Ekstrak disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol, lalu diuapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah dipanaskan 105°C dan ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen sari larut etanol<sup>(19)</sup>.

### **4.3 Penapisan Fitokimia**

#### **4.3.1 Alkaloid**

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia dilembabkan dengan 5 mL amonia 25% dan digerus dalam mortir, kemudian ditambahkan 20 mL kloroform dan digerus kuat-kuat. Campuran tersebut dilewatkan melalui kertas saring dan ditambahkan pereaksi Dragendorf. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna merah atau jingga pada kertas saring. Filtrat tersebut

diekstraksi kembali dengan menggunakan larutan HCl 10% dan larutannya dipisahkan. Kemudian dibagi 2, filtrat pertama ditambahkan pereaksi Mayer hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih dan filtrat kedua ditambahkan pereaksi Dragendorf<sup>(21)</sup>.

#### **4.3.2 Flavonoid**

Sebanyak 1 gram simplisia ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 15 menit kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan Mg dan ditambahkan 2 mL larutan alkohol-HCl (1:1), dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Pengamatan positif bila timbul warna merah atau jingga pada lapisan amil alkohol<sup>(21)</sup>.

#### **4.3.3 Tanin**

Sebanyak 1 gram simplisia ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 15 menit, kemudian disaring dan disiapkan 3 tabung reaksi yang masing-masing berisi 5 mL larutan filtrasi. Tabung 1 direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 1% (positif senyawa fenol jika terbentuk warna biru tinta atau hitam), tabung 2 ditambahkan gelatin (positif tanin jika terbentuk endapan putih), kemudian pada tabung 3 ditambahkan pereaksi Steasny (formaldehid 30% : HCl 2:1 ). Kemudian dipanaskan dalam penangas air 90°C (terbentuknya endapan merah muda menunjukkan simplisia positif mengandung tanin katekat), endapan tabung 3 disaring dan filtrat dijenuhkan dengan natrium asetat lalu ditambahkan dengan larutan besi (III) klorida 1% (terbentuknya warna biru tinta atau hitam menunjukkan endapan positif mengandung tanin galat)<sup>(21)</sup>.

#### 4.3.4 Fenol

Sebanyak 0,1 gram simplisia ditambahkan dengan 1 mL metanol, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 3 tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Adanya senyawa fenol ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau sampai hitam<sup>(21)</sup>.

#### 4.3.5 Saponin

Sebanyak 1 gram simplisia ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 15 menit kemudian disaring. Sebanyak 10 mL filtrat dalam tabung reaksi dikocok selama 10 detik dan didiamkan selama 10 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil meskipun sudah ditambahkan beberapa tetes  $\text{HCl}$  2N<sup>(21)</sup>.

#### 4.3.6 Steroid/Triterpenoid

Sebanyak 1 gram simplisia dimaserasi dengan eter selama 2 jam kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 mL diuapkan dalam cawan penguap, pada residu ditambahkan 2 tetes asam asetat kemudian ditambahkan beberapa tetes asam sulfat pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu-biru-hijau<sup>(21)</sup>.

#### 4.3.7 Kuinon

Sebanyak 1 gram simplisia ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 15 menit, kemudian disaring. Jika dalam sampel tidak terdapat tanin, maka ke dalam 5 mL ditambahkan beberapa tetes  $\text{NaOH}$ . Hasil positif jika terbentuk warna merah.

Jika ada tanin maka simplisia 2 gram serbuk sampel dimaserasi dalam 20 mL HCl 19% selama 1 jam, lalu larutan disaring dan dibagi 2 pada tabung 1 sebanyak 5 mL diekstraksi dengan benzen dan tabung 2 sebanyak 5 mL diekstraksi dengan campuran eter-kloroform (2:1), kedua fase organik masing-masing diuapkan sampai 0,5 mL, kedua ekstrak masing-masing dikocok dengan larutan NaOH 30%. Positif kuinon jika terbentuk warna jingga merah<sup>(21)</sup>.

#### 4.4 Ekstraksi

Proses ekstraksi ditujukan untuk menarik komponen kimia dalam bahan alam. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Sebanyak 500 gram simplisia dimaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 5 liter selama 3x24 jam. Maserat etanol yang diperoleh disaring dan dipisahkan dari ampasnya. Maserat yang didapat dikumpulkan kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary vacuum evaporatory* sampai dihasilkan ekstrak kental.

#### 4.5 Fraksinasi

Ekstrak kental diambil 10 gram ditambahkan 100 mL air panas lalu disaring. Kemudian difraksinasi dengan *n*-heksana 100 mL. Fraksinasi dengan *n*-heksana dilakukan sebanyak tiga kali, hasil fraksi *n*-heksana diuapkan sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana. Lapisan berair sisa partisi dengan *n*-heksana kemudian dipartisi lagi dengan 100 mL etil asetat sebanyak 3 kali. Lapisan etil asetat dipisahkan dan dipekatkan dan diperoleh fraksi air.

## **4.6 Pengujian Aktivitas Antioksidan**

### **4.6.1 Pembuatan Larutan DPPH**

Larutan DPPH dibuat dengan ditimbang 4 mg serbuk DPPH ( $M_r=394,32$ ) kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas. Sehingga diperoleh konsentrasi 40  $\mu\text{g/mL}$ .

### **4.6.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH**

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun putri malu dimulai dengan penentuan panjang gelombang maksimum DPPH 40  $\mu\text{g/mL}$  dilakukan dengan dipipet 2 mL larutan DPPH kemudian ditambahkan 1 mL pelarut methanol p.a. Selanjutnya diinkubasi selama 30 menit di tempat gelap, kemudian diukur dengan spektrofotometer sinar tampak pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum.

### **4.6.3 Pembuatan Larutan Vitamin C**

Larutan dibuat dengan cara ditimbang 50 mg serbuk vitamin C kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL lalu dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas, maka didapatkan larutan dengan konsentrasi 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

### **4.6.4 Pembuatan Berbagai Konsentrasi Vitamin C**

Dari larutan stok dengan konsentrasi 1000  $\mu\text{g/mL}$  dipipet sebanyak 20, 40, 60, 80, dan 10  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan dengan methanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh

konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10  $\mu\text{g/mL}$ . Disimpan dalam tempat gelap (botol vial coklat).

#### **4.6.5 Pengukuran Absorbansi DPPH Terhadap Vitamin C**

Diambil 1 mL larutan vitamin C pada berbagai konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10  $\mu\text{g/mL}$  kemudian ditambah 2 mL larutan pereaksi DPPH, dikocok sampai homogen. Selanjutnya diinkubasi selama 30 menit di tempat gelap. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang ditetapkan menggunakan spektrofotometer sinar tampak.

#### **4.6.6 Pembuatan Larutan Uji**

Larutan uji berupa ekstrak etanol daun putri malu, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air masing-masing ditimbang 50 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml lalu ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan uji ini dibuat dalam 5 seri konsentrasi. Seri konsentrasi ekstrak etanol daun putri malu (20, 30, 40, 50, 60  $\mu\text{g/mL}$ ), seri konsentrasi fraksi *n*-heksana (140, 160, 180, 200, 220  $\mu\text{g/mL}$ ), seri konsentrasi fraksi etil asetat (10, 15, 20, 25, 30  $\mu\text{g/mL}$ ), dan untuk seri konsentrasi fraksi air (60, 80, 100, 120, 140  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### **4.6.7 Pengukuran Absorbansi DPPH Terhadap Larutan Uji Daun Putri Malu**

Larutan uji berupa ekstrak etanol daun putri malu, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dibuat masing-masing 5 seri konsentrasi. Setiap konsentrasi larutan uji dipipet sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan

2 mL larutan DPPH dan didiamkan selama 30 menit. Lalu diamati absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm. Uji aktivitas ini dilakukan sebanyak 3 kali.

#### 4.6.8 Perhitungan % inhibisi

Aktivitas penangkap radikal bebas DPPH dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Setelah diperoleh hasil % inhibisi dari vitamin C, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air maka dapat ditentukan nilai IC<sub>50</sub>nya. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidan, sedangkan semakin besar nilai IC<sub>50</sub> maka aktivitas antioksidannya semakin rendah.