

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian/Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan metode analitik (*analytical*).

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai Mei 2022 di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari Banjarbaru.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah berbagai seri konsentrasi larutan uji dari ekstrak etanol 70% umbi Hati Tanah (*Angiopteris evecta*).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai EC_{50} hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% umbi Hati Tanah (*Angiopteris evecta*) dari seri konsentrasi yang diuji.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas (*Pyrex*[®]), ayakan *mesh* no. 20 (*MBT*[®]), *hot plate* (*Kenko*[®]), kuvet (*Isolab Cuvette*[®]), mikropipet (*Dragonlab*[®]), *rotary evaporator* (*IKARV10*[®]), serangkaian alat soklet (*Pyrex*[®]), spektrofotometer UV-Vis (*PG Instruments T60*[®]), timbangan analitik (*Fujitsu*[®]), vial dan *waterbath* (*Memmert*[®]).

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah amonium asetat (NH_4Ac) (*Merck*[®]), *aquadest* (*Onemed*[®]), asam asetat anhidrat (CH_3COOH) (*Merck*[®]), asam klorida (HCl) pekat (*Merck*[®]), asam sulfat (H_2SO_4) pekat (*Smart-lab*[®]), besi(III) klorida (FeCl_3) (*Merck*[®]), *copper(II) chloride dihydrate* ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (*Pudak*[®]), etanol 70% (*Onemed*[®]), etanol 96% (*Brataco*[®]), kloroform (CHCl_3) (*Merck*[®]), *kuersetin* (*Merck*[®]), magnesium (Mg) (*Merck*[®]), *neocuproine* (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline) (*Sigma-aldrich*[®]), pereaksi *dragendorff* (*Nitra Kimia*[®]), pereaksi *mayer* (*Nitra Kimia*[®]), pereaksi *wagner* (*Nitra Kimia*[®]) dan umbi Hati Tanah (*Angiopteris evecta*).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengambilan Tumbuhan Hati Tanah (*Angiopteris evecta*)

Tumbuhan Hati Tanah diambil dari daerah perbukitan Kecamatan Manuhing, Palangka Raya, Kalimantan Tengah. Bagian

yang digunakan adalah bagian umbi dari tumbuhan Hati Tanah (*Angiopteris evecta*).

3.5.2 Determinasi Tumbuhan Hati Tanah (*Angiopteris evecta*)

Determinasi tumbuhan dilakukan untuk mengetahui kebenaran identitas dengan jelas dari tumbuhan umbi Hati Tanah dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian. Determinasi telah dilakukan di Laboratorium Dasar FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru (Husiana, 2018).

3.5.3 Pembuatan Simplisia Umbi Hati Tanah (*Angiopteris evecta*)

Tumbuhan Hati Tanah diambil bagian umbinya kemudian disortasi basah untuk memisahkan kotoran yang menempel pada umbi, lalu dikupas dan ditimbang sebanyak 2 kg, selanjutnya dicuci dengan air bersih mengalir yang bebas dari zat pencemar untuk membersihkan semua kotoran yang menempel dan getahnya, kemudian dirajang menjadi bagian kecil untuk mempermudah proses pengeringan. Setelah itu umbi dikeringkan dengan cara potongan umbi disusun di wadah dengan permukaan datar lalu ditutupi kain pelindung berwarna hitam kemudian penjemuran dilakukan di bawah sinar matahari langsung sesuai persyaratan penjemuran di bawah sinar matahari langsung yaitu pada pukul 07.00-10.00 WIB, kemudian sortasi kembali simplisia yang telah kering dari pengotor dan bagian yang tidak diperlukan, lalu hitung rendemennya (Handayani & Qamariah, 2018). Simplisia umbi Hati Tanah (*Angiopteris evecta*) lalu

dihaluskan menggunakan *blender* hingga diperoleh serbuk kasar setelah diayak menggunakan *mesh* no.20 dengan ukuran partikel sebesar 850 μm (Arnida *et al.*, 2016).

3.5.4 Pembuatan Ekstrak Etanol 70% Umbi Hati Tanah (*Angiopteris evecta*)

Serbuk kasar simplisia sebanyak 50 gram diekstraksi dengan cara sokletasi menggunakan serangkaian alat soklet dan pelarut etanol 70%. Ekstraksi dilakukan dengan cara serbuk simplisia dibungkus dengan kertas saring kemudian dimasukkan dalam timbal soklet lalu ditambahkan etanol 70% sebanyak 50 ml dan masukan etanol 70% sebanyak 450 mL dalam labu alas bulat sehingga diperoleh perbandingan simplisia dan pelarut jadi 1 : 10 (Kemenkes RI, 2017). Ekstraksi dilakukan hingga cairan dalam sifon hampir tidak berwarna lagi. Ekstrak kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental, lalu dipekatkan menggunakan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak dengan bobot tetap (Kemenkes RI, 2017).

Rumus perhitungan rendemen ekstrak (Prawira *et al.*, 2015) :

$$\text{Rendemen Ekstrak (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak (g)}}{\text{Berat serbuk simplisia (g)}} \times 100$$

3.5.5 Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Umbi Hati Tanah (*Angiopteris evecta*)

a. Uji Alkaloid

Ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 1 mL Asam Klorida (HCl) 2N dan 9 mL

Aquadest, lalu dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat dibagi ke dalam tiga tabung reaksi yang berbeda. Tabung pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi *Mayer* yang reaksi positifnya akan menghasilkan endapan putih atau kuning. Tabung kedua ditambahkan 2 tetes pereaksi *Wagner* akan menghasilkan endapan coklat kehitaman. Tabung ketiga ditambahkan 2 tetes pereaksi *Dragendorff* yang akan menghasilkan endapan merah bata. Alkaloid dianggap positif apabila terbentuk endapan atau paling sedikit dua atau tiga dari pengujian (Fitriyanti *et al.*, 2020).

b. Uji Fenol

Ekstrak sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan *aquadest* kemudian ditambahkan dengan 2 tetes larutan Besi(III) Klorida (FeCl_3) 10%. Ekstrak mengandung fenol jika terbentuk warna hijau, ungu, biru atau hitam (Ramadhan *et al.*, 2020b).

c. Uji Flavonoid

Ekstrak sebanyak 1 gram ditambahkan dengan 10 mL *aquadest* panas, didihkan selama 5 menit kemudian saring dalam keadaan panas. Filtrat diambil sebanyak 3 mL dimasukkan dalam tabung reaksi dan tambahkan serbuk Magnesium (Mg) secukupnya untuk mengoksidasi sampel, kemudian ditambahkan 1 mL Asam Klorida (HCl) pekat dan 1 mL amil alkohol. Selanjutnya tabung reaksi dikocok kuat dan dibiarkan memisah

menjadi dua lapisan. Ekstrak mengandung flavonoid jika terbentuk warna kuning, jingga, hingga merah pada lapisan amil alkohol (Fitriyanti *et al.*, 2020; Nugrahani *et al.*, 2016).

d. Uji Saponin

Ekstrak sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan 5 mL air panas dalam tabung reaksi, setelah dingin kocok kuat tabung reaksi selama 10 detik, maka akan terbentuk buih. Ekstrak mengandung saponin jika setelah ditambahkan Asam Klorida (HCl) 2 N buih tetap stabil selama tidak kurang dari 10 menit dan tinggi buih 1-10 cm (Fitriyanti *et al.*, 2020).

e. Uji Steroid/Triterpenoid

Ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2-3 mL Kloroform (CHCl_3), 10 tetes Asam Asetat Anhidrat (CH_3COOH) dan 3 tetes Asam Sulfat (H_2SO_4) pekat (pereaksi *Liebermann-Burchard*) melalui dinding tabung kemudian kocok, terjadi perubahan warna biru sampai hijau menunjukkan adanya steroid, sedangkan perubahan warna merah atau ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Ramadhan *et al.*, 2020b).

f. Uji Tanin

Ekstrak sebanyak 0,1 gram dilarutkan dengan 10 mL *aquadest* panas, kemudian dinginkan dan saring. Filtrat

ditambahkan larutan gelatin 1%. Ekstrak mengandung tanin jika terbentuk endapan putih (Fitriyanti *et al.*, 2019).

3.5.6 Pembuatan Larutan Untuk Analisis Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan Larutan *Copper(II) Chloride Dihydrate* ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,01 M

Larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M disiapkan dengan cara menimbang $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,04262 gram kemudian dilarutkan dengan *aquadest*, setelah larut masukan dalam labu ukur 25 mL dan cukupkan volumenya dengan *aquadest* hingga tanda batas 25 mL (Maryam *et al.*, 2015).

b. Pembuatan Larutan *Neocuproine* (Nc) 0,0075 M

Larutan Nc 0,0075 M disiapkan dengan cara menimbang *neocuproine* (Nc) sebanyak 0,039 gram kemudian dilarutkan dengan etanol 96%, lalu masukan dalam labu ukur 25 mL dan dicukupkan volumenya dengan etanol 96% hingga tanda batas 25 mL (Maryam *et al.*, 2015).

c. Pembuatan Larutan *Buffer Amonium Asetat* (NH_4Ac) 1 M pH 7,0

Larutan NH_4Ac 1 M pada pH 7 disiapkan dengan cara menimbang NH_4Ac sebanyak 1,927 gram kemudian dilarutkan dengan *aquadest*, lalu ukur pH larutan menggunakan pH meter hingga diperoleh nilai pH 7, lalu masukan dalam labu ukur 25 mL dan cukupkan volumenya dengan *aquadest* hingga tanda batas 25 mL (Maryam *et al.*, 2015).

d. Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

Larutan Kuersetin dibuat dengan cara menimbang Kuersetin sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam etanol 96% dalam labu ukur 10 mL sehingga didapat larutan induk konsentrasi 1000 µg/mL, selanjutnya encerkan lagi menjadi 100 µg/mL dengan memipet 1 mL larutan induk 1000 µg/mL ke dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya dengan etanol 96% hingga tanda batas 10 mL, lalu dibuat pengenceran seri konsentrasi yaitu 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, dan 5 µg/mL yang dibuat dengan memipet 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL dan 500 µL menggunakan mikropipet dari larutan induk 100 µg/mL dan dimasukkan pada masing-masing labu ukur 10 mL kemudian dicukupkan volumenya dengan etanol 96% hingga tanda batas 10 mL (Baidah, 2019).

e. Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol 70% Umbi Hati Tanah (*Angiopteris evecta*)

Larutan Ekstrak dibuat dengan cara menimbang ekstrak sampel sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam etanol 96% dalam labu ukur 10 mL sehingga didapat larutan induk konsentrasi 1000 µg/mL, selanjutnya dilakukan pengenceran seri konsentrasi yaitu 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL dan 125 µg/mL dengan memipet 250 µL, 500 µL, 750 µL, 1.000 µL dan 1.250 µL menggunakan mikropipet dari larutan induk 1000 µg/mL dan dimasukkan pada masing-masing

labu ukur 10 mL kemudian dicukupkan volumenya dengan etanol 96% hingga tanda batas 10 mL (Ouncharoen *et al.*, 2017).

3.5.7 Analisis Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode CUPRAC

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Reagen CUPRAC

Reagen CUPRAC disiapkan dengan mencampurkan larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M sebanyak 1 mL, larutan Nc etanolik 0,0075 M sebanyak 1 mL, larutan buffer NH_4AC 1 M sebanyak 1 mL dalam vial, kemudian ditambahkan *aquadest* sebanyak 0,1 mL dan etanol 96% sebanyak 1 mL (Adisaputra, 2020), kemudian di inkubasi selama 60 menit (Nugraha *et al.*, 2017). Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-600 nm (Ramadhan *et al.*, 2020a).

b. Penentuan *Operating Time*

Penentuan dilakukan dengan cara larutan kuersetin konsentrasi 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dipipet sebanyak 1 mL, kemudian dimasukkan dalam vial dan ditambahkan 1 mL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, 1 mL Nc etanolik 0,0075 M, 1 mL larutan buffer NH_4Ac 1 M, dan 0,1 mL *aquadest*. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 2 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Rahayu *et al.*, 2021).

c. Pengukuran Absorbansi Larutan Blanko

Reagen CUPRAC disiapkan dengan mencampurkan larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M sebanyak 1 mL, larutan Nc etanolik 0,0075 M sebanyak 1 mL, larutan buffer NH_4AC 1 M sebanyak 1 mL dalam vial, kemudian ditambahkan *aquadest* sebanyak 0,1 mL dan etanol 96% sebanyak 1 mL, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruangan menyesuaikan hasil *operating time*. Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang yang telah didapat dari pengukuran panjang gelombang maksimum (Ramadhan *et al.*, 2020a). Pengujian dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

d. Pengujian Aktivitas Antioksidan Senyawa Pembanding Kuersetin dan Ekstrak Etanol 70% Umbi Hati Tanah (*Angiopteris evecta*)

Pengukuran aktivitas antioksidan senyawa pembanding kuersetin dan ekstrak sampel dilakukan dengan cara setiap seri konsentrasi kuersetin dan ekstrak sampel dipipet 1 mL lalu dimasukkan ke dalam vial yang berbeda-beda dan ditambahkan 1 mL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, 1 mL Nc etanolik 0,0075 M, 1 mL larutan buffer NH_4Ac 1 M, dan 0,1 mL *aquadest*. Larutan sampel diinkubasi menyesuaikan hasil *operating time*, kemudian absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis

pada panjang gelombang maksimum (Ramadhan *et al.*, 2020a).

Pengujian dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

e. Penentuan Persen Kapasitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan sampel uji terhadap reagen CUPRAC digambarkan sebagai persen kapasitas yang dapat dihitung berdasarkan rumus berikut (Adisaputra, 2020) :

$$\begin{aligned} \text{Abs}_{\text{sampel}} &= \text{Abs}_{\text{uji}} - \text{Abs}_{\text{blanko}} \\ \text{Abs}_{\text{sampel}} &= -\text{Log } T_s \\ T_s &= \text{Antilog Abs}_{\text{sampel}} \\ \% \text{ Kapasitas} &= (1 - T_s) \times 100\% \end{aligned}$$

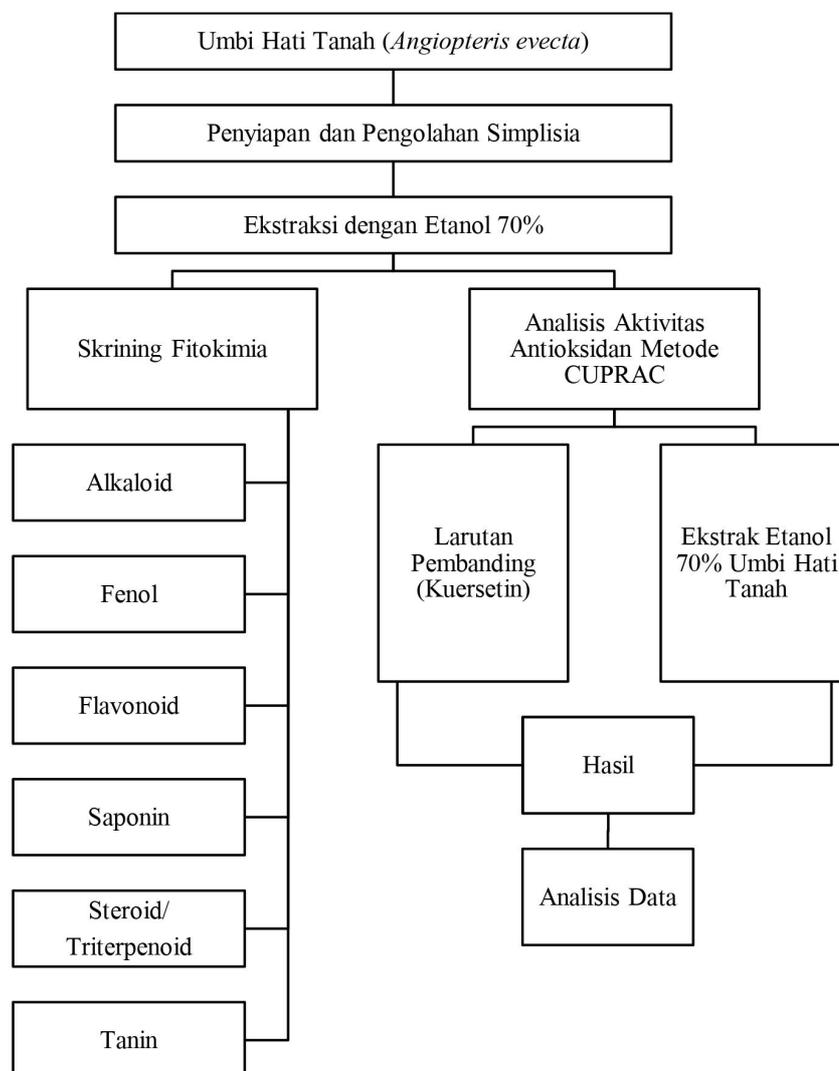
3.6 Analisis Data

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% umbi Hati Tanah (*Angiopteris evecta*) dinyatakan dengan nilai *Effective Concentration* (EC_{50}) melalui persamaan regresi linear yang menyatakan hubungan antara konsentrasi sampel uji dengan persen kapasitas, sehingga diperoleh persamaan garis $y = bx + a$. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai EC_{50} dari sampel yang dinyatakan dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai EC_{50} . Aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dapat digolongkan berdasarkan nilai EC_{50} yang diperoleh, semakin kecil nilai EC_{50} berarti semakin tinggi daya aktivitas antioksidan (Adisaputra, 2020). Kategori aktivitas antioksidan dapat dilihat pada tabel 2 (Wulandari *et al.*, 2013).

Tabel 2. Kategori Aktivitas Antioksidan

Kategori	Besaran EC ₅₀
Sangat kuat	< 50 µg/mL
Kuat	50-100 µg/mL
Sedang	101-150 µg/mL
Lemah	151-200 µg/mL

3.7 Kerangka Penelitian

**Gambar 3.** Kerangka Penelitian