

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui perbandingan pengaruh metode ekstraksi maserasi dan sokletasi terhadap aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol 70% daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz) dengan metode DPPH.

3.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan mulai bulan Januari hingga April 2022 dan tempat yang digunakan untuk penelitian ini adalah :

- (1) Laboratorium Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari Banjarbaru untuk melakukan proses ekstraksi daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz)
- (2) Laboratorium Kimia Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari Banjarbaru untuk melakukan penimbangan bahan, membuat larutan, dan melakukan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz) dengan spektrofotometri UV-Vis.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Sampel pada penelitian ini adalah daun Balik Angin yang diekstraksi dengan etanol 70% menggunakan metode maserasi dan soklet.

3.3.2. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah daun Balik Angin yang diekstraksi dengan etanol 70% menggunakan metode maserasi dan soklet.

3.4. Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- (1) Variabel bebas : Variasi konsentrasi ekstrak dari masing-masing hasil ekstraksi dengan maserasi dan sokletasi.
- (2) Variabel terikat : Aktivitas antioksidan berupa nilai IC₅₀.
- (3) Variabel kontrol : Suhu dan kondisi ruangan sewaktu inkubasi.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas seperti labu ukur (*Pyrex*®), alat soklet (*Pyrex*®), gelas ukur (*Pyrex*®), tabung reaksi (*Iwaki*®), gelas beker (*Pyrex*®), pipet tetes, *rotary evaporator* (*IKRF10*®), mikropipet (*Dragon Lab*®), spektrofotometer UV-Vis (*T60*®), timbangan analitik (*Ohaus*®), kuvet (*Quartz*

Cuvette®), penangas air (*Bionex*®), aluminium foil (*Klinpak*®), spatula, batang pengaduk, vial, *waterbath* (*Memmert*®), dan *stopwatch*.

3.5.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz), aquadest (*Brataco*®), etanol 70% (*OneMed*®), metanol p.a (*Merck*®), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) (*Himedia*®), kuersetin (*Merck*®), HCl pekat (*Merck*®), FeCl₃ (*Merck*®), kloroform (*Smartlab*®), asam asetat anhidrat (*Merck*®), serbuk magnesium (*Merck*®), H₂SO₄ (*Smartlab*®), gelatin 1% (*Merck*®), NaCl (*Brataco*®), reagen Mayer (*Nitra Kimia*®), *Dragendroff* (*Nitra Kimia*®), dan *Wagner* (*Nitra Kimia*®).

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Pengambilan Sampel

Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz) diperoleh dari daerah Mandi Angin Timur yang terletak di Kecamatan Karang Intan, Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan. Sampel yang digunakan berupa daun hijau yang segar dan masih ada di pohonya.

3.6.2. Determinasi Sampel

Determinasi dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Pusat Penelitian Biologi Cibinong Bogor.

3.6.3. Pembuatan Simplisia Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz)

Sampel tanaman daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz) yang sudah dikumpulkan dilakukan proses sortasi basah yang mana sampel dicuci dengan air bersih mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada sampel. Lalu daun dikeringkan di ruang yang terbuka tidak terkena sinar matahari langsung sambil ditutupi dengan kain hitam. Sampel daun yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender sampai menjadi serbuk kemudian diayak dengan mesh no 40 (Fuentes *et al.*, 2020; Cock, 2020).

3.6.4. Pembuatan Ekstrak Etanol 70% Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz)

a. Maserasi

Serbuk kering daun Balik Angin ditimbang sebanyak 50 g, kemudian dimaserasi dengan menambahkan etanol 70% sebanyak 500 ml dimasukkan kedalam sampel, dilakukan pengadukan sesekali. Setelah 24 jam, saring dengan kain flanel. Filtrat yang telah dipisahkan diuapkan, dan ampas diekstraksi kembali dengan pelarut baru. Perlakuan dilakukan sebanyak tigakali. Ekstrak kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat dan residu. Ekstrak

cair yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*, kemudian diuapkan di atas *waterbath* hingga didapatkan bobot tetap dari daun Balik Angin. Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus : (Sutomo *et al.*, 2016).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$

b. Sokletasi

Simplisia daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz) ditimbang sebanyak 35 g dibungkus menggunakan kertas saring dan diikat pada kedua sisinya kemudian ditempatkan didalam bidal lalu diekstraksi dengan 250 etanol 70% menggunakan peralatan soklet sampai siklus tidak berwarna dengan suhu 70°C. Pelarut yang digunakan diuapkan pada suhu 50°C menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* sampai diperoleh bobot tetap dan kemudian disimpan pada suhu kamar (Ahmed *et al.*, 2019).

3.6.5. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Baun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz)

a. Uji Fenol

Sampel ekstrak etanol 70% daun Balik Angin ditimbang sebanyak 0,1 g, kemudian ditambahkan dengan dua tetes larutan FeCl₃10%, hasil uji positif mengandung senyawa fenol apabila menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam menunjukkan positif mengandung fenolik (Ramadhan *et al.*, 2020).

b. Uji Flavonoid

Sampel ekstrak etanol 70% daun Balik Angin ditimbang sebanyak 0,1 g, kemudian ditambahkan dengan 2 mg serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat, sampel positif mengandung flavonoid apabila ada menimbulkan perubahan warna merah, kuning, atau jingga. Sampel ditambah 0,1 mg serbuk Mg dan 0,4 ml amil alkohol, kemudian campuran dikocok. Adanya flavanoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alcohol (Ramadhan *et al.*, 2020).

c. Uji Alkaloid

Sampel ekstrak etanol 70% daun Balik Angin ditimbang sebanyak 0,5 g, lalu ditambahkan 5 ml HCl, kemudian dibagi kedalam tiga tabung reaksi, pada tabung pertama ditambahkan pereaksi *Mayer*, tabung kedua ditambahkan pereaksi *Dragendorff*, tabung ketiga ditambahkan pereaksi *Wagner*. Kandungan alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan merah jingga dengan pereaksi *Dragendorff*, endapan putih dengan pereaksi *Mayer* dan endapan coklat oleh pereaksi *Wagner* (Ramadhan *et al.*, 2020).

d. Uji Tanin

Sebanyak 0,1 g ekstrak etanol 70% daun Balik Angin dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan larutan gelatin 1% yang mengandung NaCl. Kandungan tanin ditunjukkan dengan adanya endapan putih (Ramadhan *et al.*, 2020).

e. Uji Saponin

Sampel ekstrak etanol 70% daun Balik Angin ditimbang sebanyak 0,1 g kemudian ditambahkan dengan 10 ml aquadest, dikocok selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan 1 ml HCl 2 N. Hasil dinyatakan positif apabila buih yang terbentuk stabil setelah penambahan HCl 2 N (Ramadhan *et al.*, 2020).

f. Uji Steroid-Triterpenoid

Sampel ekstrak etanol 70% daun Balik Angin ditimbang sebanyak 0,1 g kemudian ditambahkan 2-3 ml kloroform dan sepuluh tetes asam asetat anhidrat serta dua sampai tiga tetes H₂SO₄ pekat (pereaksi *Lieberman-Burchard*) melalui dinding tabung. Uji positif steroid memberikan warna biru sampai hijau, sedangkan terbentuknya warna merah atau ungu menandakan bahwa ekstrak positif mengandung triterpenoid (Ramadhan *et al.*, 2020).

3.6.6. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin)

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM

Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM dilakukan dengan menimbang DPPH sebanyak 7,89 mg. Lalu, dilarutkan dengan metanol p.a hingga 50 ml, dalam labu ukur dan dilakukan vortex sampai homogen, kemudian ditempatkan ke dalam botol gelap (Adelia, 2021).

b. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH

Tahapan ini dilakukan dengan memasukkan 1 ml larutan DPPH 0,4 mM ke dalam vial gelap dan dicampur dengan 4 ml metanol p.a. dan ditutup dengan aluminium foil, dihomogenkan dalam *vortex* dan dituangkan ke dalam kuvet dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500-600 nm (Putri *et al.*, 2019).

c. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan menambahkan 1 ml larutan DPPH 0,4 mM dan 4 ml larutan kuersetin 3 ppm. Campuran kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh sebelumnya dalam interval 5 menit selama 1 jam hingga mencapai absorbansi yang stabil (Putri *et al.*, 2019).

d. Pengujian Larutan Blanko DPPH

Pengujian dilakukan dengan cara memipet 1 ml larutan DPPH 0,4 mM, kemudian dimasukkan ke dalam vial gelap dan dicampur dengan 4 ml metanol p.a. Kemudian campuran ditutup dengan aluminium foil. Larutan tersebut kemudian dihomogenkan dalam *vortex*, kemudian diinkubasi dalam ruangan gelap dan disimpan selama *operating time* yang diperoleh sebelumnya. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum (Putri *et al.*, 2019).

e. Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

Pengujian ini dilakukan dengan menimbang kuersetin sebanyak 10 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml kemudian dilarutkan

dengan metanol p.a. sampai mencapai tanda batas labu ukur 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Lalu dibuat pengenceran 100 ppm, kemudian kuersetin diambil sebanyak 250, 500, 750, 1000, 1250 μ L/ml, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai 25 ml. ke dalam labu ukur, sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar kuersetin sebanyak 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm (Patria *et al.*, 2013).

f. Pengujian Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding Kuersetin

Pengujian ini dilakukan dengan mengukur masing-masing seri larutan kuersetin sebanyak 4 ml dan memasukkannya kedalam vial. Kemudian menambahkan 1 ml larutan DPPH 0,4 mM ke dalam setiap vial. Lalu menghomogenkan dan inkubasi sesuai dengan waktu yang diperoleh pada *operating time*. Kemudian, gunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur serapan pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan (Sutomo *et al.*, 2016; Putri *et al.*, 2019).

g. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Etanol 70% Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz)

Pengujian ini dilakukan dengan menimbang masing-masing 50mg ekstrak etanol 70% daun Balik Angin hasil maserasi dan soklet. Kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. lalu larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml. kemudian tambahkan metanol p.a. sampai batas volume yang cukup pada labu ukur (1000 ppm), lalu di buat seri konsentrasi 3 ppm, 6 ppm, 9 ppm, 12 ppm, dan 15 ppm sebanyak 25 mL dari larutan induk, dengan cara mengambil sebanyak 75, 150, 225, 300, 375 μ L/ml dari larutan induk (Adelia, 2021).

h. Pengujian Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol 70% Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz)

Pengujian ini dilakukan dengan mengukur aktivitas antioksidan kuantitatif menggunakan uji DPPH. Ekstrak etanol 70% daun Balik Angin dengan variasi konsentrasi 3, 6, 9, 12, dan 15 ppm masing-masing sebanyak 4 ml, ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0,4 mM ditempatkan dalam ruangan gelap selama *operating time* setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Persentase penghambatan DPPH dihitung kemudian hasilnya dinyatakan dalam IC₅₀ (ppm) (Ramadhan & Forestryana 2021).

3.7. Analisa Data

3.7.1. Penentuan Persen Inhibisi Ekstrak Terhadap DPPH

Pengukuran dengan spektrofotometer UV- Vis diperoleh data absorbansi blanko (nilai absorbansi larutan DPPH dalam etanol) dan absorbansi sampel (nilai absorbansi dari larutan DPPH dalam etanol ditambah sampel). Berdasarkan data tersebut dapat dihitung % inhibisi dari aktivitas antioksidannya dengan rumus sebagai berikut (Haryoto, 2019) :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Setelah mendapatkan nilai % inhibisi, kemudian dibuat persamaan garis linear untuk bisa menentukan nilai IC₅₀ (besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat menangkap radikal bebas sebanyak 50%).

3.7.2. Penentuan Nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*)

Hubungan antara konsentrasi sampel uji/pembanding dan persen (%) inhibisi didapat persamaan regresi linear $y = bx + a$. Persamaan tersebut untuk menentukan nilai IC₅₀ dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC₅₀ (Nurjanah & Abdullah, 2011). Klasifikasi daya antioksidan dikategorikan berdasarkan nilai IC₅₀ seperti pada tabel 2 berikut ini :

Tabel 2. Kategori nilai IC₅₀

Nilai IC ₅₀	Kategori
<50 ppm	Sangat kuat
50-100 ppm	Kuat
100-150 ppm	Sedang
150-200 ppm	Lemah
200-250 ppm	Sangat lemah

3.7.3. Penentuan Analisis Data Menggunakan SPSS

Data (konsentrasi dan absorbansi) yang telah didapat dari hasil penelitian (kuersetin dan sampel) kemudian dianalisis dengan menggunakan SPSS versi 15 untuk melihat apakah ada perbedaan dari metode maserasi dan metode sokletasi. Uji analisis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Jika data yang diperoleh berdistribusi normal dan homogen, maka selanjutnya dilakukan uji One Way ANOVA. Jika data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen, maka analisis dilakukan dengan menggunakan uji non parametrik yaitu uji Kruskal-Wallis. Sedangkan untuk menentukan apakah ada perbedaan signifikan secara

statistik antara dua atau lebih kelompok variabel, maka analisis menggunakan uji Mann-Whitney.