

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari isolat minyak atsiri kulit batang (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz) dengan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*) dan jenis penelitian berupa deskriptif dan eksploratif dengan indikator IC₅₀.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Juni sampai Juli 2022 dan tempat yang digunakan untuk melakukan penelitian ini adalah :

- a. Laboratorium Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari Banjarbaru untuk melakukan proses destilasi dari kulit batang (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz).
- b. Laboratorium Kimia Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari Banjarbaru untuk menimbang bahan, membuat larutan, dan melakukan pengujian aktivitas antioksidan dari isolat minyak atsiri kulit batang (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz) dengan metode DPPH.

3.3 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini merupakan varian konsentrasi dari minyak atsiri pada kulit batang (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz).

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan yang ditunjukkan oleh nilai IC₅₀.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas seperti alat destilasi, aluminium foil, batang pengaduk, corong pisah, gelas ukur (*Pyrex*[®]), gelas beker (*Pyrex*[®]), labu ukur (*Pyrex*[®]), mikropipet (*Dragon Lab*[®]), penangas air, plat KLT Silica gel 60 GF₂₅₄ (*Merck*[®]), pipet tetes, spektrofotometer UV-Vis (*PG Instrument*[®]), spatula, stopwatch, timbangan analitik (*Ohaus*[®]), tabung reaksi (*Iwaki*[®]), kuvet (*Quartz Cuvette*[®]), vortex (*Bionex*[®]), dan vial.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit batang (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz), aquadest, asam galat (*Sigma*[®]), asam asetat anhidrat (*Merck*[®]), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (*Merck*[®]), etil asetat (*Bratachem*[®]), metanol p.a (*Merck*[®]), kertas saring (*Whatmen*[®]).

3.5 Prosedur penelitian

3.5.1 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel kulit batang Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz) diperoleh dari Gunung Tahura (Mandiingin) Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Sampel yang digunakan berupa Kulit Batang yang masih segar dan langsung dari pohonnya yang berumur \pm 25 tahun (Sakka, 2018).

3.5.2. Determinasi sampel

Determinasi tanaman Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz) dilakukan di Laboratorium Herbarium Bogoriense bidang Botani Pusat Riset BRIN, Cibinong.

3.5.3 Pembuatan Simplisia Kulit Batang (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz)

Tumbuhan yang digunakan telah berusia cukup dewasa dan diambil sebanyak 1.208 gram, agar didapatkan senyawa metabolit sekunder yang maksimal dan seragam. Proses penyiapan simplisia dengan melakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran atau bahan asing. Sampel yang diambil dilakukan pencucian dengan air bersih untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada bahan, kemudian melakukan penirisan untuk mengurangi jumlah air yang masih menempel pada simplisia. Perajangan dilakukan untuk memperluas permukaan bahan sehingga mempermudah proses pengeringan. Proses pengeringan dilakukan di bawah sinar matahari tidak langsung, kemudian dilakukan sortasi kering untuk memisahkan bahan organik asing dan simplisia yang

rusak akibat proses sebelumnya. Selanjutnya dilakukan penyerbukan terhadap simplisia kering yang diperoleh (Sutomo dkk., 2016).

3.5.4 Pembuatan Isolat Minyak Atsiri Kulit Batang *Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz dengan alat Destilasi

Dibuat sebanyak 200 gram simplisia kulit batang (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz) ditempatkan pada alat hidrodistilasi (penyulingan) mencampur bersama dengan 500 mL aquadest dalam labu alas bundar. Suhu operasi adalah 60-100°C dan ekstraksi dilakukan antara 2 sampai 4 jam. Minyak atsiri dipisahkan dari hidrolit dengan partisi cair-cair dalam corong dan ambil dengan mikropipet jika jumlahnya sedikit. Larutan isolat ini disuspensikan dalam metanol pada konsentrasi akhir 1000 ppm dan disimpan pada suhu 4°C dalam botol gelap untuk analisis aktivitas antioksidan (Martinez dkk., 2014).

3.5.5 Pemeriksaan Organoleptik

Pemeriksaan organoleptik dilakukan dengan mengamati bentuk, bau, dan rasa isolat minyak atsiri dari simplisia kulit batang Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz).

3.5.6 Uji aktivitas antioksidan secara kualitatif terhadap isolat minyak atsiri kulit batang Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz) menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Proses KLT dilakukan dengan menggunakan fase gerak/eluen yang sesuai, dengan cara dilakukannya optimasi eluen sampai didapatkan memisahkan senyawa dan memiliki rentang Rf yang baik. Fase diam yang digunakan adalah silica gel 60 GF₂₅₄. Setelah dibuat eluen, larutan eluen tersebut dijenuhkan terlebih dahulu dengan menggunakan kertas

saring. *Eluen* ditunggu sampai mencapai batas atas dari kertas saring (Hidayatullah, 2019; Samosir dkk., 2018).

Setelah eluen dijenuhkan dilanjutkan dengan pembuatan fase diam plat silika gel 60 Gf₂₅₄ dengan ukuran 7,5 cm x 1,5 cm kemudian diaktivasi di oven pada suhu 110°C selama 30 menit. Plat tersebut diberi batas atas 0,5 cm dan bawah 1,0 cm. setelah itu dilakukan penotolan sampel larutan baku, sampel ditotolkan menggunakan pipa kapiler. Penotolan isolat minyak atsiri dilakukan pada garis bawah yang telah dibuat. Kemudian dibiarkan beberapa saat. Selanjutnya, plat dimasukkan ke dalam *chamber* tertutup yang berisi *eluen* dengan posisi fase gerak berada dibawah garis. Setelah eluen mencapai batas atas, plat KLT diangkat dan dibiarkan kering diluar (Dewi dkk., 2018; Samosir dkk., 2018).

Kemudian dilakukan perhitungan Rf, jika nilai Rf besar berarti daya pisah zat yang dilakukan solvent (*eluennya*) maksimum sedangkan jika nilai Rf kecil berarti daya pisah zat dilakukan solvent (*eluennya*) minimum. Rf yang optimum yaitu berada pada rentang 0,2-0,8 (Muttaqin dkk., 2016; Samosir dkk., 2018). Nilai Rf didapat dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Gandjar & Rohman, 2012) :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh fase gerak}}$$

Selanjutnya bercak yang diperoleh disemprot dengan DPPH. Sampel yang memiliki aktivitas antioksidan akan memberikan warna kuning dengan latar belakang ungu setelah disemprot dengan larutan DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM (Amin, 2015).

3.6 Uji Kuantitatif Aktivitas Antioksidan Isolat Minyak Atsiri dari Kulit Batang (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz) dengan metode DPPH menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

3.6.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM

Dibuat larutan dengan cara diambil DPPH sebanyak 0,0039 gram, larutkan DPPH dengan metanol p.a yang kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL sehingga didapatkan larutan DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM. Larutan tersebut kemudian ditutup dengan aluminium foil agar terlindung dari cahaya dan harus selalu dibuat baru (Patria dkk, 2013).

3.6.2 Penetapan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan untuk mendapatkan serapan yang maksimal (Mulangsri, 2017). Larutan blanko DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 5 mL. Sampel DPPH yang sudah dilarutkan dengan metanol p.a didiamkan selama 30 menit ditempat gelap (Bakti dkk., 2017). Serapan larutan di ukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500-600 nm, panjang gelombang maksimal diperoleh dari nilai absorbansi yang maksimum (Putri dkk., 2019).

3.6.3 Pengujian Larutan Blanko DPPH

Dibuat sebanyak 1 mL larutan DPPH dimasukkan dalam labu ukur 5 mL, lalu ditambahkan dengan metanol p.a sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit yang didapatkan pada suhu kamar (Rahmatika, 2017). Kemudian diukur

serapannya pada panjang gelombang maksimum (Ramadhan & Forestryana, 2021)

3.6.4 Pembuatan Larutan Pembanding Asam Galat

Dibuat larutan pembanding asam galat ini dilakukan dengan cara ditimbang asam galat sebanyak 0,01 gram yang kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dengan metanol p.a sampai mencapai tanda batas labu ukur 10 mL, sehingga diperoleh larutan stok 1000 ppm (Patria dkk., 2013). Larutan stok asam galat diambil sebanyak 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125 mL, kemudian masing-masing diencerkan metanol p.a dalam labu ukur 25 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar asam galat sebesar 0,2 ppm; 0,4 ppm; 0,6 ppm; 0,8 ppm; 1 ppm (Ramadhan & Forestryana, 2021).

3.6.5 Pengujian Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding Asam Galat

Pengujian ini dilakukan dengan cara mengukur masing-masing seri larutan asam galat sebanyak 4 mL, yang kemudian dimasukkan ke dalam vial dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH (0,4 mM) ke dalam masing-masing vial (Mulangsri, 2017) lalu di-vortex dan inkubasi di ruang gelap selama 30 menit. Larutan asam galat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya (Ramadhan & Forestryana, 2021).

3.6.6 Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Minyak Atsiri dari Kulit Batang (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm & Binn. Ex Kurz)

Dibuat sebanyak 50 mg minyak atsiri yang telah dilarutkan dengan metanol p.a di dalam labu ukur 25 mL dicukupkan volumenya

dengan metanol p.a sampai tanda batas (1000 ppm) dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi 10 ppm; 20 ppm; 30 ppm; 40 ppm; dan 50 ppm. Lalu masing-masing larutan sebanyak 4 mL ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM (Boligon dkk., 2013). Larutan uji dari masing-masing konsentrasi didiamkan selama 30 menit yang didapatkan pada suhu kamar di ruang gelap menurut Rahmatika (2017) dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Ramadhan & Forestryana, 2021).

3.7 Analisis Data

3.7.1 Penentuan Persen Inhibisi Isolat Terhadap DPPH

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *inhibitory concentration* 50% atau IC₅₀ didapatkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50 pada persamaan regresi linier antara konsentrasi dan % inhibisi (Katrin & Bendra, 2015). Nilai persen inhibisi (% inhibisi) dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut :

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

Keterangan :

Absorbansi blanko : Serapan radikal DPPH 0,4 mM pada panjang gelombang maksimal

Absorbansi sampel : Serapan sampel dalam radikal DPPH 0,4 mM pada panjang gelombang maksimal (Abdullah, 2014).

3.7.2 Penentuan Nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*)

Hubungan antara konsentrasi sampel uji atau perbandingan dan persen inhibisi didapat dari persamaan regresi linear $y = bx - a$.

Persamaan tersebut untuk menentukan nilai IC_{50} dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi efektif ekstrak yang dibutuhkan untuk meredam 50% dari total DPPH, sehingga nilai 50 disubstitusikan untuk nilai y dan akan didapat nilai x sebagai nilai IC_{50} . Penentuan nilai IC_{50} dapat dihitung dengan menggunakan rumus : $x = \frac{(y - a)}{b}$

Keterangan:

y : % inhibisi (50)

a : Intercept (perpotongan garis di sumbu y)

b : Slope (kemiringan)

x : IC_{50}

Tabel 2. Kategori nilai IC_{50} (Bahriul dkk., 2014)

Nilai IC_{50}	Kategori Antioksidan
<50 ppm	Sangat kuat
50-100 ppm	Kuat
100-150 ppm	Sedang
150-200 ppm	Lemah
>200 ppm	Sangat lemah