

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental secara *in vitro* untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb) dengan metode DPPH.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada Januari hingga Juli 2021. Tempat yang digunakan dalam penelitian adalah Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Analisis STIKES Borneo Lestari Banjarbaru.

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk, blender, botol sprai, cawan penguap, *chamber*, corong kaca (*pyrex*®), kuvet, vial, lampu UV, neraca analitik (*Scout pro*®), pipa kapiler, pipet tetes, pipet ukur (*pyrex*®), pipet mikro (*Socorex*), *rotary evaporator* (*Ikrf10*®), sendok tanduk, spatula, spektrofotometer UV-Vis (T60), *stopwatch*, tabung reaksi (*Iwaki*), vial, *waterbath* (*Memmert*®), aluminium foil, toples, pisau, bejana KLT, kertas saring, labu ukur dan kaca arloji.

3.3.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb), *aquadest*, DPPH, kuersetin, FeCl₃, etil asetat, metanol, etanol, plat KLT silica gel 60 GF254, pereaksi *Mayer*, *Dragendoff*, *Wegner*, Mg, HCl, amil alkohol, CHCl₃, asam asetat anhidrat (C₄H₆O₃), H₂SO₄ pekat (pereaksi *Liebermann-buchard*), larutan gelatin, NaCl, NaOH, n-heksana.

3.4. Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- a. Variabel bebas adalah seri konsentrasi uji dari konsentrasi ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.).
- b. Variabel terikat adalah aktivitas/kandungan antioksidan dilihat berdasarkan bercak KLT serta nilai dari IC₅₀ dari ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.).

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Pengambilan Bahan

Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb) penelitian ini diambil di daerah Liang Anggang, Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Bagian tanaman yang digunakan adalah Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.).

3.5.3. Pembuatan Simplisia Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb)

Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.) yang telah dikumpulkan, dilakukan proses sortasi basah, kemudian dicuci dengan air mengalir dan bersih. Setelah dicuci, umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.) dirajang agar proses pengeringan cepat dan merata. Kemudian Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.) dikeringkan dengan bantuan sinar matahari dengan ditutup kain hitam dengan ditutupi kain hitam mulai jam 8 pagi sampai jam 11 siang atau dengan cara diangin-anginkan. Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.) yang telah kering, dilakukan sortasi kering, ditimbang, kemudian hasil simplisia dihaluskan menggunakan *blender* dan diayak dengan ayakan *mesh* 40 lalu disimpan kedalam wadah yang tertutup baik dan rapat (Fitriyanti *et al.*, 2019).

3.5.4. Pembuatan Ekstrak Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb)

Serbuk umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.) ditimbang 250 gram kemudian dimasukkan kedalam bejana maserasi. Maserasi dilakukan dengan cara dimasukkan tiga bagian (750 mL) pelarut etil asetat ke dalam bejana maserasi, dengan direndam dan diaduk beberapa kali selama 6 jam pertama kemudian didiamkan selama 18 jam. Kemudian dipisahkan hasil maserasi dengan cara menyaring ampas. Selanjutnya diremaserasi sebanyak dua kali dengan pelarut yang sama dan metode yang sama dengan sebelumnya. Filtrat

dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator*, kemudian dimasukkan dalam cawan penguap dan diuapkan di atas *waterbath* sampai terbentuk ekstrak kental (Wahhab, 2019). Setelah didapatkan ekstrak kental ditimbang sampai bobot tetap dan dihitung rendemennya dengan rumus sebagai berikut (Parasibu & Setyawati, 2011).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak pekat}}{\text{bobot sampel yang di ekstrak}} \times 100\%$$

3.3.5. Skrining Fitokimia

a. Identifikasi Alkaloid

Ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb) ditimbang sebanyak 0,2 g dilarutkan dalam 5 ml HCl, kemudian disaring. Filtrat yang didapatkan digunakan sebagai sebagai larutan uji yang dilakukan sebagai berikut :

1. Larutan ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.) diambil 1 mL lalu dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi *Mayer*, hasil positif dengan terbentuknya endapan berwarna putih hingga kekuningan.
2. Larutan ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb) diambil 1 mL lalu dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi *Dragendoff*, hasil positif dengan terbentuknya endapan coklat (Tiwari *et al.*, 2011 Prawdharjo, 2014)

3. Larutan ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb) diambil 1 mL lalu dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes peraksi *Wegner*, hasil positif dengan terbentuknya endapan coklat hingga kecoklatan (Tiwari *et al.*, 2011).

b. Identifikasi Flavonoid

Ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb) ditimbang sebanyak 0,5 g ekstrak kental ditambahkan 10 ml *aquadest*, kemudian ditambahkan 0,1 g magnesium, dan beberapa tetes asam klorida serta amil alkohol. Larutan dikocok dan dibiarkan memisah. Hasil positif terbentuknya warna orange atau kuning pada lapisan amil alkohol (Tiwari *et al.*, 2011).

c. Identifikasi Saponin

Ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb) ditimbang sebanyak 0,3 g ekstrak kental ditambahkan 2 mL *aquadest*, kemudian dikocok selama 10 detik. Hasil positif terbentuknya buih yang stabil setelah penambahan HCl selama kurang dari 10 menit (Tiwari *et al.*, 2011).

d. Identifikasi Triterpenoid dan Steroid

Ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb) ditimbang sebanyak 0,5 mg ekstrak kental dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, selanjutnya ditambahkan 0,5 mL anhidrida asetat. Kemudian tambahkan 2 mL H₂SO₄ (Roanisca, 2018). Larutan

ekstrak dibiarkan selama beberapa menit jika hasil positif steroid memberikan warna biru atau hijau terdapat cincin sedangkan hasil positif triterpenoid memberikan warna merah atau ungu (Astuti *et al.*, 2011).

e. Identifikasi Fenol

Ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb) sebanyak 0,3 g ekstrak kental ditambahkan 3-4 tetes larutan FeCl_3 1 %. Hasil positif terbentuknya warna hitam hijau kebiruan (Tiwari *et al.*, 2011).

f. Identifikasi Tanin

Ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb) sebanyak 0,2 g ekstrak kental ditambahkan 2 tetes larutan gelatin 1% dalam NaCl. Hasil positif terbentuknya endapan putih (Tiwari *et al.*, 2011).

g. Identifikasi Kuinon

Ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb) beberapa gram dilarutkan dengan sedikit aqudest dimasukkan ke dalam gelas kimia. Selanjutnya dipanaskan di atas penangas air kemudian angkat dan biarkan dingin. Setelah dingin saring kemudian filtrat yang diperoleh ditambahkan NaOH 5% hasil positif mengandung kuinon ditandai adanya perubahan warna kuning hingga merah (Hidayah *et al.*, 2015).

3.6. Uji Antioksidan

3.6.1. Pengujian Antioksidan Secara Kualitatif dengan KLT

Ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.) dibuat sebanyak 50 mg dan dilarutkan dengan etanol secukupnya. Kemudian plat KLT silika gel GF254 dilakukan aktivasi terlebih sebelum digunakan dengan cara dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 15 menit yang digunakan sebagai fase diam. Pelarut yang digunakan untuk *eluen* (fase gerak) yaitu n-heksana dan etil asetat (8:2) (Zirconia *et al.*, 2015). Tahap selanjutnya *chamber* yang berisi *eluen* terpilih dijenuhkan dahulu (Ghosal & Mandal, 2012). Penjenuhan *eluen* (fase gerak) dilakukan sebelumnya di dalam *chamber* dengan menggunakan kertas saring dan ditunggu sampai *eluen* sampai mencapai batas atas dari kertas saring (Syamsul & Supomo, 2013).

Ekstrak etil asetat umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.) totolkan pada Plat KLT silika gel 60 GF254 menggunakan pipa kapiler dengan volume 15 µL. Fase diam disiapkan dengan ukuran 9,5 cm x 1,5 cm. Masing-masing bagian diberi garis batas, yaitu pada bagian bawah 1 cm dan atas 0,5 cm (Syamsul & Supomo, 2013).

Plat KLT silika gel GF254 dikeluarkan dari *chamber*, kemudian dikeringkan dan diamati di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm kemudian disemprot dengan larutan DPPH 0,5 mM (Ghosal

& Mandal, 2012). Bercak pada KLT yang memiliki aktivitas antioksidan akan berubah warna menjadi kuning dengan latar belakang ungu setelah disemprot dengan larutan DPPH (Prawirodiharjo, 2014). Perubahan warna yang terjadi disebabkan oleh adanya senyawa dalam sampel yang mendonorkan atom hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi bentuk yang lebih stabil yaitu DPPH-H (Pratiwi *et al*, 2013). Kemudian dihitung Rf bercak pada plat KLT dengan rumus dibawah :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh fase gerak}} \times 100\%$$

3.6.2. Pengujian Antioksidan Secara Kuantitatif dengan metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 3,9432 mg dilarutkan dengan metanol *p.a* dan dimasukkan dalam labu ukur 25 mL. Volume dicukupkan dengan metanol *p.a* hingga tanda batas, kemudian larutan di homogenkan menggunakan *vortex* hingga larut dan ditempatkan dalam botol gelap (Putri *et al.*, 2019).

b. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH

Larutan DPPH 0,4 mM di ambil sebanyak 1 mL masukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 4 mL metanol *p.a*, tutup dengan aluminium foil, dihomogenkan lalu diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit kemudian dituangkan kedalam kuvet dan diukur di spektrofotometer UV-

Vis pada panjang gelombang (γ) 450-650 nm (Saripudin & Hariyadi, 2018).

c. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan DPPH 0,4 mM sebagai blanko diambil sebanyak 1 mL di tambahkan metanol p.a sebanyak 4 mL, masukkan dalam vial dan dikocok dengan *vortex* hingga homogen, kemudian diinkubasi larutan selama 30 menit di ruang gelap dalam suhu kamar (20°-25°C), serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Saripudin & Hariyadi, 2018).

d. Pembuatan Larutan Induk Pembanding Kuersetin

Kuersetin ditimbang 50 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml. Kemudian larutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas dan kocok sampai homogen, didapatkan larutan induk kuersetin dengan konsentrasi 1000 ppm (Adawiyah & Rizki, 2018).

e. Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Pembanding Kuersetin

Larutan induk 1000 ppm diambil sebanyak 2,5 mL , diencerkan menjadi 100 ppm dalam labu ukur 25 mL metanol p.a, kemudian dibuat seri konsentrasi berbeda yaitu 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm dari 100 ppm diencerkan masing-masing 25 mL metanol p.a dalam labu ukur (Adawiyah & Rizki, 2018).

f. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Pengujian antioksidan dilakukan dengan cara masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 4 mL kemudian masukkan ke dalam vial gelap, masing-masing ditambahkan 1 mL DPPH 0,4 mM kemudian dihomogenkan dengan dikocok dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Diukur serapannya dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum setelah diinkubasi selama *operating time* (Aminah *et al.*, 2016).

g. Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Etil Asetat Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb)

Larutan induk etil asetat dibuat terlebih dahulu dengan menimbang 50 mg ekstrak kemudian dilarutkan dengan metanol p.a dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Volume dicukupkan dengan metanol p.a sampai tanda batas dengan konsentrasi 1000 ppm dalam 50 mL (Hasanah *et al.*, 2017)

h. Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Ekstrak Etil Asetat Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb)

Larutan induk diambil 10 mL diencerkan menjadi 100 ppm dalam 100 mL metanol p.a dan dibuat beberapa variasi konsentrasi yaitu, 10 ppm, 30 ppm, 50 ppm, 70 ppm, dan 90 ppm dalam labu ukur 10 mL dari 100 ppm yang diencerkan dalam labu ukur 25 mL metanol p.a (Hidayah *et al.*, 2015).

i. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Larutan Uji Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Larutan uji diambil masing-masing 4 mL dari konsentrasi 10 ppm, 30 ppm, 50 ppm, 70 ppm, dan 90 ppm ditambahkan 1 mL DPPH 0,4 mM lalu dihomogenkan dengan dikocok dan diinkubasi selama *operating time* pada suhu kamar. Diukur serapannya dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Aminah *et al.*, 2016).

3.7. Analisa Data

Aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat Umbi Bawang Dayak (*Eletherine bulbosa* Urb.) dapat diukur dengan parameter nilai IC₅₀ (*Inhibition Concentration* 50%). IC₅₀ adalah nilai konsentrasi senyawa antioksidan yang menyebabkan hilangnya 50% aktivitas DPPH (Jami'ah *et al.*, 2018). Perhitungan IC₅₀ diperlukan data persen Inhibisi radikal DPPH dari hasil uji kuantitatif melalui spektrofotometer UV-Vis dari absorbansi kontrol dan sampel dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Inhibisi Radikal DPPH} = \frac{(\text{Abs Blanko} - \text{Abs Sampel})}{\text{Abs Blanko}} \times 100\%$$

Perhitungan IC₅₀ menggunakan persamaan regresi linier $y = bx + a$, sumbu y sebagai penghambat 50% oksidasi, dan sumbu x sebagai bilangan menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50% (Aminah *et al.*, 2016).

Keterangan :

y : % inhibisi (50)

a : *Intercept* (perpotongan garis disumbu y)

b : *Slope* (kemiringan)

x : Konsentrasi

Hasil dari data yang disajikan berupa tabel dan grafik dengan menghubungkan konsentrasi *versus* % inhibisi ketika dapat menangkap radikal bebas DPPH sebanyak 50%, kemudian dianalisis dengan analisis regresi linier menggunakan *Microsoft Excel* untuk menentukan nilai IC₅₀.

Penentuan nilai IC₅₀ dapat dihitung dengan menggunakan rumus $IC_{50} = \frac{(50-a)}{b}$

Tabel 1. Kategori antioksidan (Mustarichie *et al*, 2017)

Nilai IC ₅₀	Kategori
<50 µg/mL	Sangat Kuat
51-100 µg/mL	Kuat
101-150 µg/mL	Sedang
151-500 µg/mL	Lemah
>500 µg/mL	Tidak Aktif