

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui perbandingan pengaruh pelarut metanol dan etanol 70% dengan metode ekstraksi maserasi terhadap aktivitas antioksidan daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) dengan metode CUPRAC.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2024 sampai dengan Maret 2024 dan tempat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

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

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz).

3.3.2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian daun dari tanaman Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) yang diperoleh dari kawasan Bukit Tahura, Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi masing-masing ekstrak metanol dan etanol 70% daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz).

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan berupa nilai EC₅₀.

3.4.3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah suhu dan ruangan sewaktu inkubasi.

3.5. Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini berupa alat-alat gelas (*Pyrex*[®]), ayakan *mesh* no. 40 (*MBT*[®]), cawan penguap, kuvet, *rotary evaporator* (*IKARV10*[®]), mikropipet (*Dragonlab*[®]), spektrofotometer UV-Vis (*PG Instruments T60*[®]), timbangan analitik (*Fujitsu*[®]), *waterbath* (*Memmert*[®]), sendok tanduk, spatula, batang pengaduk, dan vial.

3.5.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz), ammonium asetat (NH_4Ac) (*Merck*[®]), *aquadest* (*Onelab*[®]), asam asetat anhidrat (CH_3COOH) (*Merck*[®]), asam klorida (HCl) pekat (*Merck*[®]), asam sulfat (H_2SO_4) pekat (*Merck*[®]), besi (III) klorida (FeCl_3) (*Merck*[®]), *copper* (II) *chloride dehydrate* ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (*Merck*[®]), metanol (*Merck*[®]), etanol 70% (*Merck*[®]), etanol 96% (*Brataco*[®]), kloroform (CHCl_3), kuersetin (*Sigma-aldrich*[®]), *neocuproine* (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline) (*Sigma-aldrich*[®]), pereaksi Mayer (*Nitra Kimia*[®]), pereaksi Dragendroff (*Nitra Kimia*[®]) dan pereaksi Wagner (*Nitra Kimia*[®]).

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Pengambilan Sampel Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz)

Sampel daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) diambil dari Tahura, Karang Intan, Kalimantan Selatan. Sampel yang digunakan berupa daun tua yang berwarna hijau segar dan masih berada di pohomnya (Rosyada, 2022).

3.6.2. Determinasi Sampel Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz)

Determinasi tanaman 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)

Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz) segar yang telah dikumpulkan dilakukan sortasi basah, dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada sampel dan dilakukan perajangan agar mempermudah proses pengeringan. Selanjutnya daun dikeringkan di ruang yang terbuka tidak terkena sinar matahari langsung sambil ditutupi dengan kain hitam (Aprillinia, 2022). Setelah simplisia kering dilakukan sortasi kering dengan tujuan untuk memisahkan benda asing seperti bagian tanaman yang tidak diinginkan atau tidak diperlukan, lalu diblender sampai halus, dan diayak dengan pengayakan *mesh* no. 40 (Lestari *et al.*, 2023).

$$\% \text{ Rendemen simplisia} = \frac{\text{Bobot simplisia akhir}}{\text{Bobot simplisia awal}} \times 100\%$$

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

Sampel sebanyak 50 g simplisia daun Balik Angin di ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan masing-masing pelarut metanol dan etanol 70% sebanyak 500 ml selama 24 jam di suhu ruang serta dilakukan pengadukan sesekali. Kemudian disaring menggunakan kertas saring dan maserat diekstraksi kembali dengan pelarut baru sebanyak dua kali (Cock, 2020; Fuentes *et al.*, 2020). Filtrat dipisahkan dengan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50 °C lalu dipekatkan dengan *waterbath* suhu 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental dengan bobot tetap. Bobot tetap yang dimaksud yaitu ditimbang sebanyak dua kali dan hasil perbedaan penimbangan tidak melebihi 0,5 mg dengan timbangan analitik (Depkes RI, 2017; Rosyada, 2022).

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

3.6.5. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol dan Etanol 70% Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz)

a. Uji Fenol

Sampel masing-masing ekstrak metanol dan etanol 70% daun Balik Angin ditimbang sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya sebanyak 2 mL, lalu ditambahkan

dengan dua tetes larutan FeCl_3 10%. Jika terbentuk warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam menunjukkan positif mengandung fenolik (Ramadhan *et al.*, 2020b).

b. Uji Flavonoid

Sampel masing-masing ekstrak metanol dan etanol 70% daun Balik Angin ditimbang sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan dengan 2 mg serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat, setelah itu ditambahkan dengan amil alkohol. Ekstrak positif mengandung flavonoid jika menimbulkan warna merah, kuning atau jingga (Ramadhan *et al.*, 2020b).

c. Uji Alkaloid

Sampel masing-masing ekstrak metanol dan etanol 70% daun Balik Angin ditimbang sebanyak 0,1 g, kemudian ditambahkan dengan HCl 2N. Larutan yang diperoleh kemudian dibagi pada tiga tabung reaksi yang berbeda untuk ditambahkan pereaksi *Mayer* pada tabung 1, pereaksi *Dragendroff* pada tabung 2, dan pereaksi *Wagner* pada tabung 3. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan merah jingga dengan pereaksi *Dragendroff*, endapan putih dengan Pereaksi *Mayer*, dan endapan cokelat dengan pereaksi *Wagner* (Ramadhan *et al.*, 2020b).

d. Uji Tanin

Sampel masing-masing ekstrak metanol dan etanol 70% daun Balik Angin ditimbang sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan gelatin 1%. Kandungan tanin ditandai dengan terbentuknya endapan putih (Ramadhan *et al.*, 2020c).

e. Uji Saponin

Sampel masing-masing ekstrak metanol dan etanol 70% daun Balik Angin ditimbang sebanyak 0,1 g ditambahkan dengan 10 mL *aquades* hangat. Kemudian dikocok selama 10 detik dan terbentuk buih lalu dibiarkan selama 10 menit. Tambahkan 1 mL HCl 2 N. Hasil uji positif saponin jika buih yang terbentuk stabil setelah penambahan HCl 2 N (Ramadhan *et al.*, 2020b).

f. Uji Steroid-Triterpenoid

Sampel masing-masing ekstrak metanol dan etanol 70% daun Balik Angin ditimbang sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan dengan 2 mL kloroform, 10 tetes asam asetat anhidrat dan tiga tetes H₂SO₄ pekat (pereaksi *Lieberman-Burchard*) pada dinding tabung reaksi. Uji positif steroid jika terbentuk warna biru sampai hijau dan jika terbentuk warna merah atau ungu artinya positif triterpenoid (Ramadhan *et al.*, 2020b).

3.6.6. Pembuatan Larutan Untuk Analisis Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan Larutan CUPRAC

1. Pembuatan Larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M

Larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M dibuat dengan menimbang 0,04262 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, kemudian dilarutkan dengan menggunakan *aquadest* sampai larut, setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan dengan *aquadest* sampai tanda batas (Maryam *et al.*, 2016).

2. Pembuatan Larutan *Buffer* Ammonium Asetat (NH_4Ac) pH 7

Larutan NH_4Ac pH 7,0 dibuat dengan menimbang sebanyak 1,927 g NH_4Ac , kemudian dilarutkan dengan *aquadest*, lalu diukur pH larutan dengan menggunakan pH meter sampai diperoleh nilai pH sebesar 7,0. Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan dengan *aquadest* sampai tanda batas (Maryam *et al.*, 2016).

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

Larutan *neocuproine* (Nc) 0,0075 M dibuat dengan menimbang *neocuproine* sebanyak 0,039 g, kemudian dilarutkan dengan menggunakan etanol 96% sampai larut, setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas (Maryam *et al.*, 2016).

b. Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

Larutan pembanding kuersetin dibuat dengan membuat larutan induk konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ dengan cara kuersetin ditimbang sebanyak 10 mg, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas. Kemudian diencerkan menjadi 100 $\mu\text{g/mL}$, dengan cara dipipet sebanyak 1 mL larutan induk kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya menggunakan etanol 96% sampai tanda batas. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$ dan 5 $\mu\text{g/mL}$ dengan cara larutan kuersetin 100 $\mu\text{g/mL}$ dipipet masing-masing sebanyak 100, 200, 300, 400, 500 μL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang terpisah dan ditambahkan dengan etanol 96% sampai tanda batas pada masing-masing labu ukur tersebut (Awwaliyah, 2023).

c. Pembuatan Larutan Ekstrak Metanol dan Etanol Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz)

Sampel masing-masing ekstrak metanol dan etanol 70% dibuat larutan induk dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Larutan dibuat dengan cara masing-masing ekstrak metanol dan etanol 70% ditimbang sebanyak 50 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL yang berbeda dan dicukupkan volumenya dengan etanol 96% sampai tanda batas. Kemudian diencerkan menjadi 100 $\mu\text{g/mL}$, dengan cara sebanyak 1 mL larutan induk dipipet dari

masing-masing ekstrak, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya etanol 96% sampai tanda batas. Setelah itu dibuat seri konsentrasi 3 $\mu\text{g/mL}$, 6 $\mu\text{g/mL}$, 9 $\mu\text{g/mL}$, 12 $\mu\text{g/mL}$ dan 15 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 10 mL dari larutan induk dengan cara masing-masing diambil sebanyak 300, 600, 900, 1.200 dan 1.500 μL pada masing-masing ekstrak metanol dan etanol 70% (Awwaliyah, 2023).

3.6.7. Penentuan Perbandingan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol dan Etanol 70% Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz)

a. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum Reagen CUPRAC

Penentuan panjang gelombang dilakukan dengan menyiapkan reagen CUPRAC dengan cara larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M sebanyak 1 mL dicampurkan dan ditambahkan dengan larutan *neocuproine* (Nc) etanolik 0,0075 M serta larutan *buffer* ammonium asetat 1 M masing-masing sebanyak 1 mL. Kemudian ditambahkan 1 mL etanol 96% dan 0,1 mL *aquadest* ke dalam vial lalu diinkubasi selama 60 menit. Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 400-600 nm (Nugraha *et al.*, 2017; Haeria *et al.*, 2018).

b. Pengukuran Absorbansi Larutan Blanko CUPRAC

Pengukuran absorbansi larutan blanko CUPRAC dilakukan dengan cara larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M dicampurkan

dan ditambahkan dengan larutan *neocuproine* (Nc) etanolik 0,0075 M serta larutan *buffer* ammonium asetat 1 M masing-masing 1 mL. Kemudian ditambahkan 1 mL etanol 96% dan 0,1 mL *aquadest* ke dalam vial lalu diinkubasi dalam ruang gelap selama 60 menit. Kemudian larutan blanko CUPRAC yang sudah jadi dituang ke dalam kuvet dan dimasukkan ke dalam spektrofotometer UV-Vis untuk dibaca absorbansinya menggunakan panjang gelombang yang telah diperoleh dari hasil pengukuran panjang gelombang maksimum (Nugraha *et al.*, 2017; Sayakti *et al.*, 2022).

c. Pengukuran Absorbansi Larutan Pembanding Kuersetin

Pengukuran absorbansi larutan pembanding kuersetin dilakukan dengan cara 1 mL dari setiap seri larutan kuersetin diambil dan dimasukkan ke dalam vial yang berbeda. Masing-masing vial ditambahkan dengan larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, larutan *neocuproine* (Nc) etanolik 0,0075 M, larutan *buffer* ammonium asetat 1 M masing-masing 1 mL dan 0,1 mL *aquadest*, selanjutnya diinkubasi dalam ruangan gelap selama 60 menit. Setelah diinkubasi, masing-masing larutan dituang ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dan pengujian dilakukan dengan replikasi sebanyak tiga kali (Nugraha *et al.*, 2017; Sayakti *et al.*, 2022).

d. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol dan Etanol 70% Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. ex Kurz)

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak metanol dan etanol 70% daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz) dilakukan dengan cara sampel ekstrak metanol dan etanol 70% daun Balik Angin dipipet sebanyak 1 mL tiap serinya kemudian dimasukkan ke dalam vial yang berbeda-beda. Pada masing-masing vial ditambahkan larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, larutan *neocuproine* (Nc) etanolik 0,0075 M, larutan *buffer ammonium asetat* 1 M masing-masing 1 mL dan 0,1 mL *aquadest*, selanjutnya diinkubasi dalam ruangan gelap selama 60 menit. Kemudian absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dan pengujian dilakukan dengan replikasi sebanyak tiga kali (Nugraha *et al.*, 2017; Haeria *et al.*, 2018).

3.7. Analisis Data

3.7.1. Penentuan Persen Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan dari sampel yang diuji terhadap reagen CUPRAC digambarkan sebagai nilai persen kapasitas yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Milenia, 2022):

$$\text{Abs}_{\text{sampel}} = -\text{Log } T_s$$

$$T_s = \text{Antilog } \text{Abs}_{\text{sampel}}$$

$$\% \text{Kapasitas} = (1 - T_s) \times 100\%$$

3.7.2. Penentuan Nilai EC₅₀ (*Effective Concentration*)

Aktivitas antioksidan ekstrak metanol dan etanol 70% daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz) dinyatakan dengan nilai *Effective Concentration* (EC₅₀). Nilai EC₅₀ diperoleh melalui persamaan regresi linear yang menyatakan hubungan antara konsentrasi sampel uji dengan persentase kapasitas sehingga diperoleh persamaan garis $y = bx + a$. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai EC₅₀ sampel yang dinyatakan dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai nilai EC₅₀ (Milenia, 2022). Aktivitas antioksidan dapat digolongkan berdasarkan nilai EC₅₀ yang diperoleh, semakin kecil nilai EC₅₀ maka semakin kuat aktivitas antioksidan dalam menghambat radikal. Adapun kategori aktivitas antioksidan dari nilai EC₅₀ dapat dilihat pada tabel 1 (Martha *et al.*, 2020).

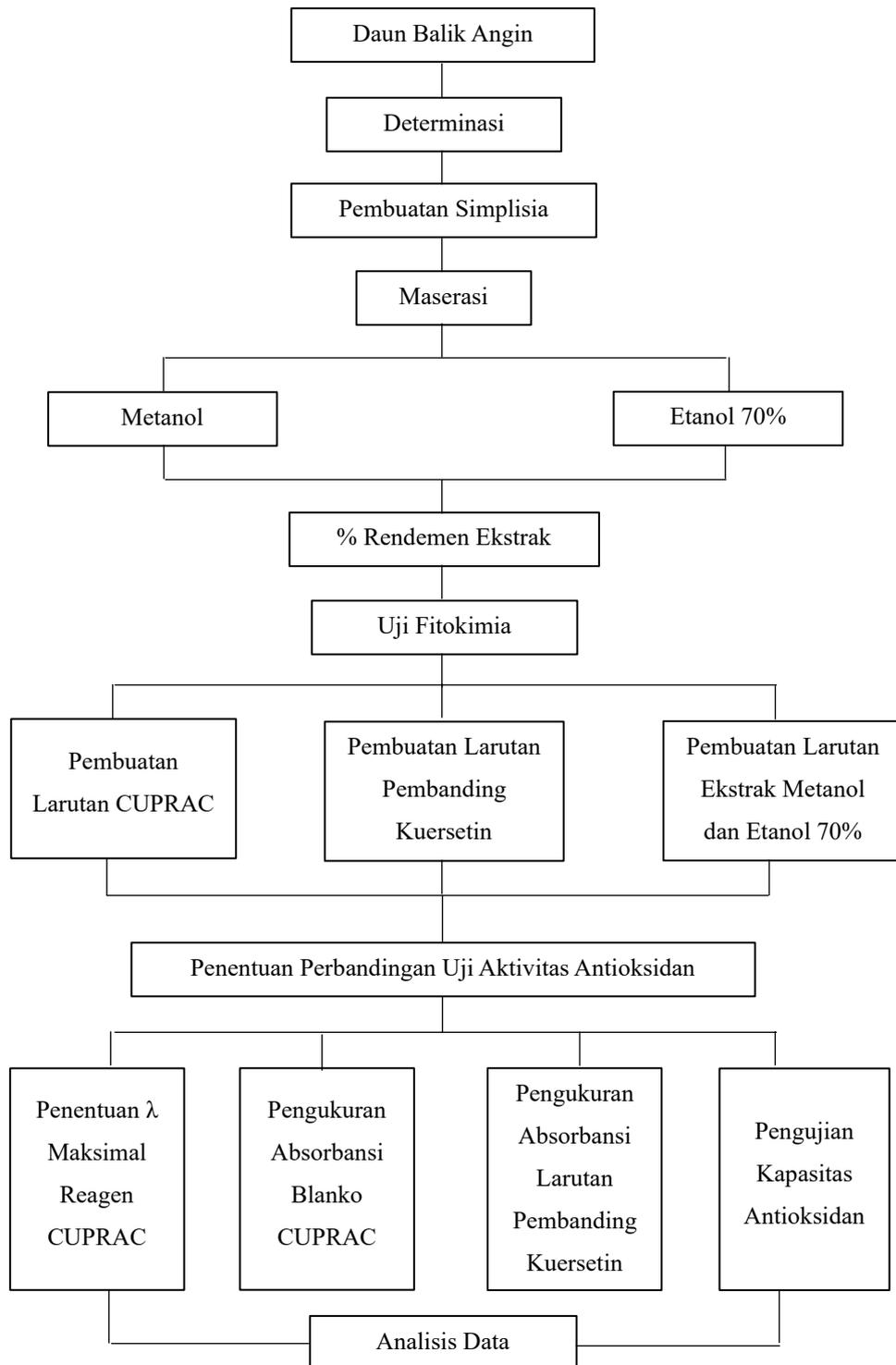
Tabel 1. Kategori Nilai EC₅₀ Aktivitas Antioksidan

Kategori	Nilai EC ₅₀
Sangat Kuat	< 50 ppm
Kuat	50 – 100 ppm
Sedang	101- 150 ppm
Lemah	151 – 250 ppm
Tidak Aktif	> 250 ppm

Setelah diperoleh nilai EC₅₀ maka data dianalisis untuk mengetahui perbedaan kapasitas antioksidan dari ekstrak metanol dan etanol 70% daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz) diuji dengan menggunakan SPSS versi 24. Uji

normalitas data diuji dengan menggunakan *Levene's Test*, jika data terpenuhi dilanjutkan dengan analisis *One Way Anova*. Namun, jika uji normalitas dan homogenitas tidak terpenuhi maka data dianalisis dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis* (Rosyada, 2022).

3.8. Alur Penelitian



Gambar 10. Alur Penelitian