

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah penelitian deksriptif disusun dengan metode analitik, yang berfungsi untuk mendeskripsikan atau memberi gambaran suatu objek yang diteliti melalui data atau sampel yang telah dikumpulkan sebagaimana adanya (Talakua, 2020). Penelitian ini menggunakan metode DPPH untuk menguji aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun durian bangkok (*Durio zibethinus* Murr.).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi dan Laboratorium Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Borneo Lestari Banjarbaru. Waktu penelitian di lakukan pada bulan Maret sampai bulan Juni 2022.

3.3 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi variabel lain, pada penelitian adalah pelarut metanol yang digunakan untuk mengekstrak daun durian bangkok (*Durio zibethinus* Murr.).
- b. Variabel terikat adalah variabel yang dapat terpengaruh akibat variabel bebas, pada penelitian adalah aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun

durian bangkok (*Durio zibethinus* Murr.) yang di nyatakan dengan nilai IC_{50} .

- c. Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan sehingga variabel bebas dan variabel terikat tidak terpengaruh oleh faktor luar, pada penelitian adalah konsentrasi DPPH, cahaya dan waktu inkubasi.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian adalah *aluminium foil*, ayakan, *beaker glass* (Pyrex®), botol kaca gelap, batang pengaduk, blender, cawan penguap, corong kaca (Pyrex®), gelas ukur (Pyrex®), *magnetic heated stirrer*, kertas perkamen, kertas saring, lemari pendingin (Sharp®), labu ukur (Pyrex®), mikropipet (Dragon Lab®), penjepit kayu, pipet tetes, *rotary evaporator* (IKFR10®), rak tabung reaksi, sendok tanduk, spektrometer UV-Vis, tabung reaksi, timbangan digital, vial coklat dan *waterbath* (Memmert®).

3.4.2 Bahan

Bahan yang akan digunakan pada penelitian adalah aquadest, amil alkohol, daun durian bangkok (*Durio zibethinus* Murr.), $FeCl_3$, gelatin, HCL, kuersetin, magnesium, metanol, metanol p.a, NaCL. pereaksi *Dregendorff*, pereaksi *Mayer*, pereaksi *Wegner*, dan serbuk DPPH.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi Tumbuhan Daun Durian (*Durio zibethinus Murr.*)

Daun durian (*Durio zibethinus Murr.*) di peroleh dari daerah Guntung Damar, Kecamatan Landasan Ulin, Kota Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Sampel yang digunakan berupa daun durian segar dengan warna hijau tua, dan panjang daun durian 13 cm diambil dari daun ke 6 hingga ke 15 (dihitung dari pucuk daun). Daun dengan ukuran dan warna sama menunjukkan daun memiliki usia dan tingkat perkembangan yang telah maksimal (Muyasaroh, 2018).

Determinasi daun durian dilakukan di Laboratorium Dasar Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

3.5.2 Pembuatan Simplisia Daun Durian Bangkok (*Durio zibethinus Murr.*)

Daun yang di kumpulkan sebanyak 1164 g dibilas dengan air mengalir, agar tidak ada kotoran yang menempel pada sampel. Dikeringkan di bawah sinar matahari di tutup dengan menggunakan kain hitam agar tidak ada debu dan kotoran lain yang menempel. Tujuan dari pengeringan untuk mengurangi kadar air pada daun durian sehingga tidak mudah ditumbuhi bakteri serta mempermudah saat melakukan proses selanjutnya (Fiteri, 2021). Simplisia yang sudah kering dilakukan sortasi kering, setelah dikeringkan simplisia di *blender* dan di ayak dengan derajat ayakan mesh 40 sehingga diperoleh serbuk

simplisia (Mahmudah, 2021). Rendemen simplisia dihitung dengan rumus:

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

3.5.3 Ekstraksi Maserasi Daun Durian Bangkok (*Durio zibethinus* Murr.)

Pembuatan ekstrak daun durian bangkok (*Durio zibethinus* Murr.) dilakukan dengan menggunakan serbuk kering daun durian sebanyak 200 g dan ditambahkan pelarut metanol sebanyak 1 L (1:5) (Sonia dkk., 2020). Kemudian dimaserasi selama 3x 24 jam dengan pelarut metanol dilakukan pengadukan setiap 6 jam. Setelah itu saring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh filtrat dan residunya. Residu penyaringan dimaserasi kembali (remaserasi) sebanyak 2 kali hingga filtrat menjadi bening. Ekstrak cair yang didapat, kemudian dipisahkan dari pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan dipekatkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 40°C sampai kental dan didapatkan bobot tetap (Febrianti dkk., 2021). Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus:

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

3.5.4 Uji Kualitatif dengan Skrining Fitokimia

1. Uji Flavonoid

Ekstrak kental daun durian sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan 5 mL aquadest. Lalu ditambahkan 10 tetes HCL pekat dan 0,2 g serbuk Mg dan 1 mL amil alkohol. Kemudian digojog dengan kuat. Terdapat senyawa flavonoid ditandai dengan berubahnya larutan menjadi warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Ergina dkk., 2014).

2. Uji Fenol

Ekstrak kental daun durian sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan 5 ml aquadest dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 tetes FeCl_3 5%. Dihomogenkan terdapat senyawa fenol ditandai dengan larutan berubah warna hijau pekat (Julianto, 2019).

3. Uji Alkaloid

Ekstrak kental daun durian sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan metanol 10 ml, ditambahkan 5 mL HCL 2 N dibagi menjadi 4 bagian dimana salah satunya sebagai pembanding (Narumi, 2017).

- a. Pereaksi *Mayer*. Larutan dipipet sebanyak 2 mL ditambahkan 5 tetes perekasi *Mayer*. Ditandai dengan larutan terbentuk endapan putih (Ergina dkk., 2014).
- b. Perekasi *Dragendroff*. Larutan dipipet sebanyak 2 mL ditambahkan 5 tetes perekasi *Dragendroff*. Ditandai dengan larutan terbentuk endapan jingga (Ergina dkk., 2014).

- c. Pereaksi *Wegner*. Larutan dipipet sebanyak 2 mL ditambahkan 5 tetes pereaksi *Wegner*. Ditandai dengan larutan terbentuk endapan coklat (Rante dkk., 2020).

4. Uji Tanin

Ekstrak kental daun Durian sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan 5 mL aquadest, kemudian ditambahkan 2 mL larutan gelatin 1% (1 g dalam 100 mL NaCL). Keberadaan tanin ditandai dengan terbentuknya endapan putih kekuningan (Fiteri, 2021).

5. Uji Saponin

Sebanyak 0,1 g ekstrak kental daun Durian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL aquadest dan di didihkan selama 2-3 menit, kemudian di dinginkan. Lalu dikocok kuat selama 1 menit dan didiamkan selama 10 menit. Terdapat senyawa saponin ditandai dengan terbentuknya busa/buih dengan tinggi 1-3 cm yang stabil selama 10 menit (Rante, 2020). Dilakukan uji penegasan dengan menambahkan 1 tetes HCL 2 M. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil (Nugrahani, 2016).

3.5.5 Uji Kuantitatif Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Durian Bangkok (*Durio zibethinus* Murr.) Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil) sebagai berikut :

1. Penyiapan Larutan DPPH 0,4 mM

Serbuk DPPH yang ditimbang sebanyak 7,8864 mg dilarutkan dengan pelarut metanol p.a hingga tanda batas labu ukur 50 mL, digojog hingga homogen. Kemudian ditempatkan ke dalam botol gelap (Sadeli, 2016).

2. Pembuatan Larutan Blanko DPPH 0,4 mM

Larutan DPPH 0,4 mM diambil menggunakan pipet sebanyak 1 mL larutan. Kemudian dimasukkan ke dalam vial coklat (5 mL) dan di tambah metanol p.a sebanyak 4 mL, kemudian dihomogenkan dan dibungkus dengan *aluminium foil*. Diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh dan diukur serapannya dengan instrument spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh sebelumnya (Fiteri, 2021).

3. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum DPPH 0,4 mM

Pengukuran panjang gelombang dapat dilakukan dengan larutan DPPH 0,4 mM diambil menggunakan pipet sebanyak 1 mL larutan. Kemudian dimasukkan ke dalam vial coklat (5 mL) dan

dilarutkan dengan metanol p.a sebanyak 4 mL hingga homogen dan dibungkus dengan *aluminium foil*. Kemudian diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh dan dituangkan ke dalam kuvet dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada rentang panjang gelombang yang digunakan adalah 500-600 nm (hingga diperoleh panjang gelombang maksimum) (Putri dkk., 2019).

4. Penentuan *Operating Time*

Larutan kuersetin 5 ppm diambil sebanyak 4 mL, lalu ditambahkan 1 mL DPPH 0,4 mM (Rizki dkk., 2021). Interval waktu 5 menit selama 60 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Sahara, 2019).

5. Pembuatan Larutan dan Pengujian Aktivitas Antioksidan Pembanding Kuersetin

Larutan pembanding kuersetin dibuat dengan ditimbang 25 mg kuersetin. Kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sebanyak 25 mL (1000 ppm), kemudian diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Dibuat beberapa variasi konsentrasi dari larutan induk yaitu: 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm sebanyak 25 mL (Fiteri, 2021).

Pengujian dilakukan dengan mengukur masing-masing (1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm) larutan kuersetin sebanyak 4 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambah 1 mL larutan DPPH 0,4 mM kedalam masing-masing tabung reaksi yang

dibungkus dengan *aluminium foil*. Diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh dan diukur serapannya dengan instrument spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh sebelumnya (Mahmudah, 2021).

6. Pembuatan Larutan dan Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Durian Bangkok (*Durio zibethinus* Murr.)

Pembuatan larutan dilakukan dengan ditimbang ekstrak sebanyak 25 mg. Lalu dilarutkan dengan metanol p.a 25 mL (1000) ppm, diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Kemudian dibuat seri konsentrasi berbagai konsentrasi (20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm) didiamkan selama *operating time* yang telah diperoleh. Kemudian dibaca pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh sebelumnya (Prasetyo dkk., 2021; Bahriul dkk., 2014).

Pengujian dilakukan dengan dimasukkan masing-masing konsentrasi larutan uji dari masing-masing larutan ekstrak (20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm) sebanyak 4 mL ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL lalu digojog hingga homogen dan ditutup *aluminium foil*, kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama *operating time* yang telah diperoleh. Serapan dari larutan tersebut diukur pada panjang gelombang yang telah didapatkan dari penentuan panjang gelombang optimum DPPH (Mahmudah, 2021).

3.6 Analisis Data

Pengukuran dengan spektrofotometri UV-Vis diperoleh data absorbansi control ($Abs_{kontrol}$) dan absorbansi sampel (Abs_{sampel}) dari ekstrak metanol daun durian. Berdasarkan data dapat dihitung presentasi inhibisi serapan DPPH dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan :

Absorbansi kontrol : Absorbansi tidak mengandung sampel

Absorbansi sampel : Absorbansi ekstrak

Setelah mendapatkan presentase inhibisi dan ditentukan nilai IC_{50} untuk menyatakan aktivitas antioksidan (Muthia dkk.,2018).

Absorbansi yang didapat, dihitung persen hambatan (%Inhibisi). Dimana y adalah hamabatan 50 senilai (50) dan x adalah nilai IC_{50} dengan persamaan regresi linear $y = ax + b$. persamaan tersebut digunakan untuk menentukan IC_{50} dari sampel. Nilai IC_{50} adalah besarnya nilai konsentrasi senyawa yang diuji untuk mengikat radikal bebas sebanyak 50% (Nauri dkk., 2020). Aktivitas antioksidan dengan menggunakan istilah IC_{50} dapat dilihat pada tabel 2 (Iqbal, 2016).

Tabel 2. Kategori antioksidan

| Nilai IC₅₀ (mg/L) | Kategori |
|-------------------------------------|-----------------|
| <50 mg/L | Sangat Kuat |
| 50 – 100 mg/L | Kuat |
| 100 – 150 mg/L | Sedang |
| >150 mg/L | Lemah |