

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui perbandingan metode ekstraksi maserasi dan sokletasi terhadap aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol daun balik angin (*Alphitonia incana*) dengan metode DPPH.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Januari 2021 sampai dengan Maret 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 ekstraksi daun balik angin (*Alphitonia incana*)
- b. Laboratorium Kimia Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari Banjarbaru untuk menimbang bahan, membuat larutan, dan melakukan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun balik angin (*Alphitonia incana*) dengan Spektrofotometri UV-Vis.

3.3 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini merupakan konsentrasi ekstrak dari masing-masing hasil ekstraksi menggunakan metode maserasi dan sokletasi.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan berupa nilai IC_{50} .

b. Variabel Kontrol

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

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

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* (*IKFR10*[®]), mikropipet (*Dragon Lab*[®]), spektrofotometer UV-Vis (*Pg Instrument*[®]), timbangan analitik (*Ohaus*[®]), kuvet (*Serena*[®]), vortex (*Bionex*[®]), aluminium foil (*Klinpak*[®]), spatula, batang pengaduk, vial, waterbath (*Memmert*[®]), Cawan penguap, dan *stopwatch*.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun balik angin (*Alphitonia incana*), metanol teknis (*Bratachem*[®]), metanol p.a (*Merck*[®]), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (*Smart Lab*[®]), kuersetin (*Sigma aldrich*[®]), HCl pekat (*Merck*[®]), FeCl₃ (*Arkitos*[®]), kloroform (*Merck*[®]), asam asetat anhidrat (*Merck*[®]), serbuk magnesium (*Merck*[®]), H₂SO₄ (*Merck*[®]), NaCl (*Merck*[®]), gelatin 1% (*Oxoid*[®]), pereaksi Dragendroff (*Merck*[®]), pereaksi Mayer (*Merck*[®]), dan pereaksi Wagner (*Merck*[®]).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengambilan Sampel

Sampel daun balik angin (*Alphitonia incana*) diperoleh dari Gunung Tahura, Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Sampel yang digunakan berupa daun balik angin yang berwarna hijau segar dan masih ada dipohon.

3.5.2 Determinasi Sampel

Determinasi tanaman balik angin (*Alphitonia incana*) dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Pusat Penelitian Biologi Cibinong-Bogor.

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

Sampel tanaman daun balik angin (*Alphitonia incana*) dilakukan sortasi basah, dengan dicuci terlebih dahulu dengan air bersih mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada sampel. Daun dikeringkan dalam ruangan yang bebas dari sinar matahari dengan menutupi sampel menggunakan kain hitam (Fuentes dkk, 2020). Sampel daun yang telah kering di haluskan sampai menjadi serbuk kemudian diayak dengan ayakan mesh 40 (Cock, 2020).

3.5.4 Pembuatan Ekstrak

a. Maserasi

Serbuk simplisia sebanyak 50 g ditimbang dan dimasukkan ke dalam bejana maserasi, kemudian metanol sebanyak 500 mL dimasukkan kedalam sampel. Sampel diekstraksi selama 24 jam dalam suhu ruangan dengan pengadukan ringan (Cock, 2020). Ekstrak disaring dan residunya di ekstraksi lagi dengan metanol dan di saring kembali sebanyak 2 kali. Ekstrak disaring menggunakan kertas saring sambil di vacuum, kemudian dikeringkan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* pada suhu 50°C sampai didapatkan bobot tetap. Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus (Fuentes dkk; 2020) :

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

b. Sokletasi

Simplisia daun balik angin (*Alphitonia incana*) sebanyak 35 g dibungkus menggunakan kertas saring dan diikat pada kedua sisinya kemudian ditempatkan didalam bidal dan diekstraksi dengan 250 mL metanol menggunakan peralatan soklet sampai siklus tidak berwarna dengan suhu <60°C. Pelarut diuapkan pada suhu 50°C menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath*. Ekstrak kental yang telah didiamkan dikeringkan sampai diperoleh massa yang konstan dan disimpan pada suhu 4°C ditempat gelap. Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus (Ahmed dkk, 2019) :

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

3.5.5 Skrining Fitokimia

a. Uji Fenol

Sampel ekstrak metanol daun balik angin ditimbang sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan pelarut metanol sebanyak 2 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan 2 tetes larutan FeCl₃ 10% kedalam tabung reaksi. Hasil uji positif mengandung senyawa fenol apabila menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam (Ramadhan dkk, 2020).

b. Uji Flavonoid

Sampel ekstrak metanol daun balik angin ditimbang sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan pelarut metanol sebanyak 2 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan 2 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat. Sampel positif mengandung flavonoid apabila menimbulkan perubahan warna merah, kuning, atau jingga (Ramadhan dkk, 2020).

c. Uji alkaloid

Sampel ekstrak metanol daun balik angin ditimbang sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan pelarut metanol sebanyak 2 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan 3-5 tetes H_2SO_4 pekat lalu dikocok hingga terbentuk dua lapisan, lapisan atas yang terbentuk dari hasil reaksi sampel dan H_2SO_4 diujikan dengan 3 reagen yaitu dragendorff, mayer, dan wagner yang baru. Sampel dinyatakan positif mengandung alkaloid dengan terbentuknya endapan merah jingga dengan pereaksi dragendorff, endapan putih dengan pereaksi mayer dan endapan coklat oleh pereaksi wagner (Ramadhan dkk, 2020).

d. Uji Tanin

Ekstrak metanol daun balik angin (*Alphitonia incana*) sebanyak 0,5 g dilarutkan dengan pelarut metanol sebanyak 2 mL, kemudian 2 mL sampel ditambahkan larutan gelatin 1% yang

dicampur dengan NaCl. Sampel positif mengandung tanin apabila ada endapan putih terbentuk (Khairiah dkk, 2018).

e. Uji Saponin

Sampel ekstrak metanol daun balik angin ditimbang sebanyak 0,1 g, kemudian ditambahkan dengan 10 mL aquadest. Ekstrak metanol daun balik angin yang sudah ditambahkan aquadest dikocok selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 menit. HCl 2 N sebanyak 1 mL ditambahkan kedalam tabung reaksi yang berisi sampel. Sampel dinyatakan positif apabila buih yang terbentuk stabil setelah penambahan HCl (Ramadhan dkk., 2020)

f. Uji Steroid-Triterpenoid

Sampel ekstrak metanol daun balik angin ditimbang sebanyak 0,1 g kemudian ditambahkan kloroform sebanyak 2-3 mL dan 10 tetes asam asetat anhidrat serta 2-3 tetes H₂SO₄ pekat (pereaksi Liebermann Burchard) ke atas plat tetes. Uji positif steroid akan memberikan warna biru sampai hijau, sedangkan warna merah atau ungu menandakan bahwa ekstrak positif mengandung triterpenoid (Ramadhan dkk, 2020).

3.5.6 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Balik Angin (*Alphitonia incana* (Roxb.) Teijsm. & Binn. Ex Kurz.) dengan metode Peredaman Radikal Bebas DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM

DPPH sebanyak 15,7 mg dilarutkan dengan metanol p.a yang kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan dicukupkan dengan metanol sampai tanda labu ukur 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).

b. Penetapan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan agar mendapatkan serapan yang maksimal (Mulangsri, 2017). Larutan blanko DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL diambil, 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 dengan panjang gelombang 500-600 nm. Panjang gelombang maksimal diperoleh dari nilai absorbansi yang maksimum (Putri dkk., 2019).

c. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mengambil 4 mL larutan kuersetin (konsentrasi 3 ppm) ditambah 1 mL larutan DPPH 0,4 mM. Sampel kemudian *divortex* dan

diukur absorbansinya setiap 5 menit selama 1 jam pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dari penentuan panjang gelombang sebelumnya. *Operating time* merupakan menit yang menghasilkan absorbansi peredaman radikal bebas DPPH paling stabil (Mulangsri, 2017).

d. Pengujian Larutan Blanko DPPH

Pengujian larutan Blanko DPPH dilakukan dengan cara dipipet DPPH 0,4 mM sebanyak 1,0 mL kemudian dicukupkan volumenya menggunakan metanol sampai 5,0 mL didalam labu ukur. Sampel kemudian dipindahkan dalam botol coklat dan dibiarkan selama *operating time*. Sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya (Wulaisfan, 2016).

e. Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

Pembuatan larutan pembanding kuersetin ini dilakukan dengan cara ditimbang kuersetin sebanyak 10 mg yang kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL. Larutan Kuersetin dilarutkan dengan metanol p.a sampai mencapai tanda batas labu ukur 10 mL sehingga didapat larutan induk 1000 ppm. Larutan induk kuersetin diambil sebanyak 25, 50, 75, 100, dan 125 μ L kemudian ditambahkan sampai 25 mL metanol p.a, dalam labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar kuersetin sebesar 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm (Patria dkk, 2013).

f. Pengujian Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding Kuersetin

Pengujian ini dilakukan dengan cara mengukur masing-masing seri larutan kuersetin sebanyak 4 mL, yang kemudian dimasukkan ke dalam vial. Seri larutan kuersetin ditambahkan 1 mL larutan DPPH (0,4 mM) ke dalam masing-masing vial. Sampel kemudian di-*vortex* dan inkubasi di ruang gelap selama *operating time*. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya (Khairiah dkk, 2018).

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

Pengujian ini dilakukan dengan menimbang masing-masing ekstrak sebanyak 50 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. Sampel dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL dan dicukupkan volumenya dengan metanol p.a sampai tanda batas (1000 ppm). Larutan induk yang diekstraksi dengan metode maserasi diambil sebanyak 75, 150, 225, 300, dan 375 μL , kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL dicukupkan volumenya dengan metanol p.a, sehingga didapat konsentrasi yang berbeda yaitu 3 ppm, 6 ppm, 9 ppm, 12 ppm, dan 15 ppm (Ramadhan & Forestryana, 2021).

Larutan induk yang diekstraksi dengan metode sokletasi diambil sebanyak 50, 100, 150, 200, dan 250 μL , kemudian

dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL dicukupkan volumenya dengan metanol p.a, sehingga didapat konsentrasi yang berbeda yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm (Ramadhan & Forestryana, 2021).

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

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

3.6 Analisis Data

3.6.1 Penentuan Persen Inhibisi Ekstrak Terhadap DPPH

Nilai DPPH yang dinyatakan sebagai persen inhibisi (% inhibisi) dihitung berdasarkan persamaan 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).

3.6.2 Penentuan Nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*)

Hubungan antara konsentrasi sampel uji atau pembanding 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} . Penentuan nilai IC_{50} dapat dihitung dengan menggunakan rumus : (Bahriul dkk, 2014).

$$IC_{50} = \frac{(50 - a)}{b}$$

Keterangan:

y : % inhibisi (50)

a : *Intercept* (perpotongan garis di sumbu y)

b : *Slope* (kemiringan)

x : Konsentrasi (IC_{50})

Pengukuran penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali dan hasil data yang akan diolah dan disajikan dalam bentuk Tabel dan grafik hubungan konsentrasi dengan % inhibisi ketika dapat menangkap radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Kemudian dianalisis dengan analisis regresi linear (Nurjanah & Abdullah, 2014) menggunakan Microsoft Excel untuk menentukan nilai IC_{50}

sebagai kontrol positif dan digunakan kuersetin sebagai pembanding. Kategori nilai IC_{50} ditunjukkan pada Tabel 2 (Saputri dkk., 2019).

Tabel 2. Kategori nilai IC_{50}

Nilai IC_{50}	Kategori Aktivitas Antioksidan
<50 ppm	Sangat kuat
50-100 ppm	Kuat
100-150 ppm	Sedang
150-200 ppm	Lemah
200-250 ppm	Sangat lemah

Data analisis untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan diuji menggunakan SPSS Versi 25. Uji normalitas data diuji dengan uji *Levene's Test*. Jika data terpenuhi, dilanjutkan dengan analisis *One Way Anova*. Jika uji normalitas dan homogenitas tidak terpenuhi, maka data dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis* (Liliyana, 2021).