

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak kulit batang pule (*Alstonia scholaris* R. Br).

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian akan dilakukan pada bulan Februari 2024 sampai dengan Juni 2024 dan tempat yang digunakan dalam melaksanakan penelitian ini adalah Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Borneo Lestari.

3.3. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah:

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi infusa kulit batang pule

b. Variabel terikat

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

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Spektrofotometer UV-Vis (*DLab*[®]), timbangan analitik (*Ohaus*[®]), kuvet (*Quartz Cuvette*[®]), mikropipet (*Dragon lab*[®]) aluminium foil, stopwatch, rak tabung reaksi, kertas saring, spatula, dan alat alat gelas (*Pyrex*[®]) laboratorium.

3.5.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kulit batang pule (*Alstonia scholaris* R. Br), kuersetin (*Sigma*), ammonium asetat (NH_4Ac) (*Pudak*[®]), *copper(II) chloride dehydrate* ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (*Pudak*), FeCl_3 (PT. Kimia Jaya) , etanol 96% (PT. Pandu Medika), *neocuproine* (*2,9 - dimethyl 1,10- phenanthroline*) (*Merck*) , H_2SO_4 pekat (*Nitrat kimia*), HCl pekat (*Nitrat kimia*), kloroform (*Nitrat kimia*) , asam asetat anhidrat (*Nitrat kimia*) , pereaksi *mayer* (*Nitrat kimia*), *wagner* (*Nitrat kimia*) , *dragendroff* (*Nitrat kimia*), aquadest (PT. Pandu Medika).

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Pengambilan Sampel Kulit Batang Pule (*Alstonia scholaris* R. Br)

Sampel kulit batang pule (*Alstonia scholaris* R. Br) diperoleh dari Kawasan Benuang, Kabupaten Tapin, Kalimantan Selatan. Sampel yang digunakan merupakan kulit batang pule yang berwarna coklat pucat.

3.5.2. Determinasi

Determinasi tumbuhan dilakukan dengan mengirimkan sampel tanaman pule (*Alstonia scholaris* R. Br) ke Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru.

3.5.3. Pembuatan Simplisia

Cara pembuatan simplisia dimulai dengan pengumpulan kulit batang pule (*Alstonia scholaris* R. Br) sebanyak 3 kg bahan, dilakukan sortasi basah dengan cara dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan zat pengotor yang menempel kemudian ditiriskan. Setelah itu dilakukan perubahan bentuk bahan dengan cara perajangan agar menjadi lebih kecil, kemudian dikeringkan dengan oven dengan suhu 40° C. Setelah proses pengeringan maka diperoleh simplisia kulit batang pule (*Alstonia scholaris* R. Br) yang siap untuk diekstraksi (Halimah *et al.*, 2021).

3.5.4. Pembuatan Infusa Kulit Batang Pule (*Alstonia scholaris* R. Br)

Kulit batang pule (*Alstonia scholaris* R. Br) diambil sebanyak 10 gram ditambah 100 ml aquadest dan dimasak selama 15 menit dengan suhu mencapai 90⁰C kemudian disaring menggunakan kertas saring dan ditambah air panas secukupnya dalam ampas lalu disaring kembali sampai diperoleh volume infusa sebanyak 100 ml (Noviyanti *et al.*, 2021).

3.5.5. Skrining Fitokimia

a. Uji Fenol

1 ml ekstrak ditambahkan ke dalam tabung reaksi bersama dengan FeCl_3 10%. Keberhasilan reaksi dicapai jika terjadi perubahan warna menjadi biru tua, biru hitam, atau hitam (Halimah *et al.*, 2021).

b. Uji Flavonoid

Ekstrak sebanyak 2 ml dipanaskan selama 5 menit kemudian disaring, setelah itu filtrat digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukan dalam tabung reaksi tambahkan serbuk Mg, 1 ml HCl pekat, 1 ml amil alkohol kemudian di kocok. Keberhasilan reaksi ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Nugrahani *et al.*, 2016).

c. Uji Alkaloid

Sebanyak 3 ml ekstrak disatukan dengan 2 ml kloroform dan 2 ml amonia, kemudian dicampur secara merata dan dipanaskan. Setelah itu, ditambahkan 3-5 tetes H_2SO_4 pekat dan diaduk dengan seksama. Lapisan atas kemudian diambil, dan diuji menggunakan pereaksi mayer; hasil positif ditandai dengan adanya endapan putih. Pengujian juga dilakukan dengan pereaksi dragendroff, yang menunjukkan hasil positif dengan adanya endapan merah jingga, serta pereaksi wagner, yang menghasilkan positif jika terdapat endapan coklat (Halimah *et al.*, 2021).

d. Uji Saponin

Ekstrak disatukan dengan 10 ml air destilasi dan dikocok hingga berbusa, setelah itu ditambahkan HCl 2 N. Keberhasilan reaksi dinyatakan positif apabila busa tetap bertahan selama 10 menit (Ramadhan *et al.*, 2020).

e. Uji Steroid-Terpenoid

Ekstrak dicampur dengan 2 ml kloroform dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 tetes asam asetat anhidrat dan 3 tetes H₂SO₄ pekat. Hasil uji reaksi positif apabila terbentuk warna merah untuk terpenoid dan terbentuk warna hijau mengandung steroid (Wulan Kusumo *et al.*, 2022).

3.5.6. Pengujian Aktivitas Antioksidan Dengan Metode CUPRAC**a. Pembuatan Larutan CUPRAC****1. Pembuatan Larutan CuCl₂·2H₂O 0,01 M**

Larutan dibuat dengan menimbang CuCl₂·2H₂O sebanyak 0,04262 gram, kemudian dilarutkan menggunakan aquadest hingga larut, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan ditambahkan dengan aquadest hingga tanda batas (Maryam *et al.*, 2016).

2. Pembuatan Larutan Buffer Ammonium Asetat (NH₄Ac) Ph 7,0

Larutan (NH₄Ac) pH 7,0 dibuat dengan menimbang (NH₄Ac) sebanyak 1,927 gram kemudian dilarutkan dengan aquadest, pH larutan diukur menggunakan pH meter hingga

diperoleh nilai pH sebesar 7,0. Selanjutnya dimasukkan dalam labu ukur 25 ml dan ditambahkan aquadest hingga 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 gram dilarutkan dengan etanol 96% hingga larut, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas (Maryam *et al.*, 2016).

b. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum CUPRAC

Pengukuran panjang gelombang dengan mengambil 1 ml larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, 1 ml *neocuproine* (Nc) 0,0075 M, 1 ml larutan *buffer* ammonium asetat 1 M, ditambahkan 1 ml etanol p.a dan 0,1 ml *aquadest* ditambahkan kemudian dimasukkan kedalam vial. Larutan kemudian dituang kedalam kuvet dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 400-600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Haeria *et al.*, 2018).

c. Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

Larutan pembanding kuersetin dibuat dengan membuat larutan induk konsentrasi 1000 ppm, dengan menimbang kuersetin sebanyak 10 mg masukan ke dalam labu ukur 10 ml dengan ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas. Kemudian diencerkan menjadi 100 ppm dengan cara dipipet sebanyak 1 ml larutan induk

dimasukan ke dalam labu ukur 10 ml dan dicukupkan menggunakan etanol p.a hingga tanda batas labu ukur 10 ml. Kemudian dibuat seri konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm dengan cara diambil larutan kuersetin 100 ppm masing-masing sebanyak 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, dan 0,5 ml. Kemudian dimasukan dalam labu ukur 10 ml yang terpisah dan ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas 10 ml (Sayakti *et al.*, 2022).

d. Pengukuran Larutan Blanko CUPRAC

Pengukuran absorbansi larutan blanko CUPRAC dengan cara larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M diambil 1 ml dicampurkan dengan *neocuproine* (Nc) 0,0075 M 1 ml ditambahkan dengan larutan *buffer* ammonium asetat 1 M sebanyak 1 ml. Kemudian ditambahkan etanol p.a sebanyak 1 ml dan *aquadest* sebanyak 0,1 ml dimasukan ke dalam vial di inkubasi selama 30 menit. Larutan blanko CUPRAC yang sudah jadi dituang ke dalam kuvet kemudian dimasukan dalam spektrofotometer UV-Vis untuk dibaca absorbansinya menggunakan panjang gelombang yang di dapat dari hasil pengukuran panjang gelombang maksimum (Sayakti *et al.*, 2022).

e. Pengukuran Absorbansi Larutan Pembanding Kuersetin

Pengukuran absorbansi larutan pembanding kuersetin dilakukan dengan cara sebanyak 1 ml diambil pada masing-masing

seri larutan kuersetin, kemudian masukan dalam vial yang berbeda. Vial yang telah di isi dengan seri larutan kuersetin ditambahkan 1 ml larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, larutan buffer ammonium asetat 1 M sebanyak 1 ml, larutan neocuproine (Nc) etanolik 0,0075 M, sebanyak 1 ml dan *aquadest* sebanyak 0,1 ml. Kemudian di inkubasi dalam waktu 30 menit. Setelah di inkubasi, masing-masing larutan masukan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang yang diperoleh (Sayakti *et al.*, 2022).

f. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Infusa Kulit Batang Pule (*Alstonia cholaris* R. Br)

Infusa kulit batang pule dibuat dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm. Masing-masing seri ditambahkan 1 ml larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, 1 ml larutan buffer ammonium asetat 1 M, 1 ml larutan neocuproine (Nc) etanolik 0,0075 M dan *aquadest* sebanyak 0,1 ml, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada ruang gelap. Setelah diinkubasi absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Sayakti *et al.*, 2022).

3.6. Analisis Data

3.6.1. Penentuan Persen Kapasitas Antioksidan

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

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

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

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

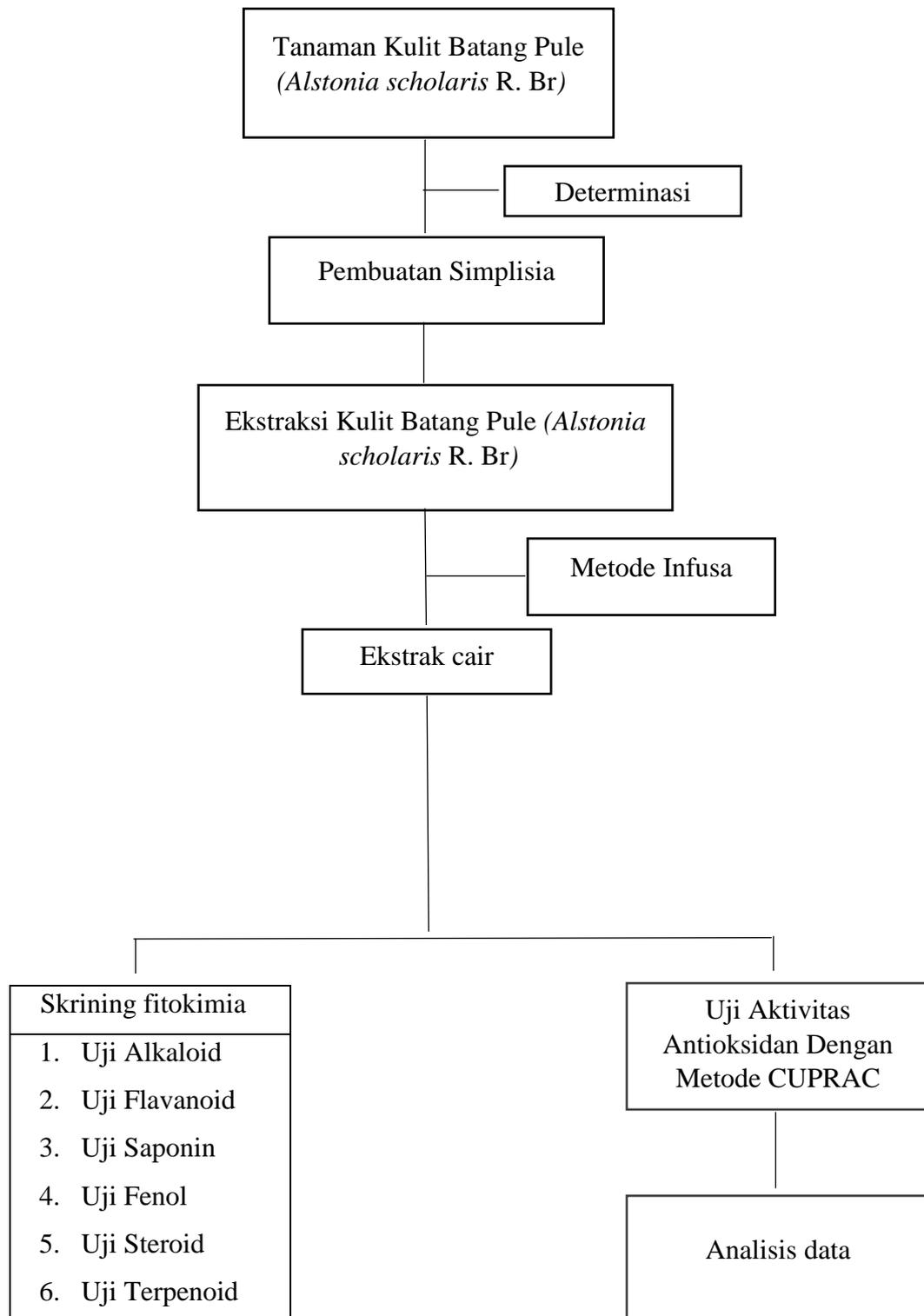
3.6.2. Penentuan Nilai EC₅₀ (*Effective Concentration*)

Aktivitas antioksidan infusa kulit batang pule (*Alstonia cholaris* R. Br) dinyatakan dengan nilai *Effective Concentration* (EC₅₀) yang menyatakan hubungan antara konsentrasi sampel uji dengan presentase kapasitas melalui persamaan regresi linear sehingga diperoleh persamaan garis $y = bx + a$. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai EC₅₀ nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai nilai EC₅₀ (Milenia,2022). Antioksidan dapat digolongkan dengan nilai EC₅₀ yang diperoleh, semakin kecil nilai EC₅₀ maka semakin kuat aktivitas antioksidan dalam menghambat radikal. Kategori aktivitas antioksidan dapat dilihat pada tabel 1 (Nurhayati *et al.*, 2022).

Tabel 1. Kategori Aktivitas Antioksidan

Kategori	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)
Sangat kuat	< 50
Kuat	50-100
Sedang	101-250
Lemah	250-500
Tidak aktif	>500

3.7. Kerangka Penelitian



Gambar 4. Kerangka Penelitian