

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini diklasifikasikan sebagai penelitian eksperimental. Dalam penelitian ini, metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrihidrazil*) digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% daun Langsat (*L. domesticum*), yang diperiksa secara kualitatif dengan skrining fitokimia dan secara kuantitatif dengan spektrofotometer UV-Vis.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Pada penelitian dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif yang bertempat di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Universitas Borneo Lestari Banjarbaru pada bulan Februari sampai dengan Mei 2024.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah semua tumbuhan Langsat (*Lansium domesticum*) yang diperoleh dari Desa Surian, Kecamatan Matraman, Kabupaten Banjar, Provinsi Kalimantan Selatan.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun Langsat (*L. domesticum*) yang diperoleh dari Desa Surian, Kecamatan Matraman, Kabupaten Banjar, Provinsi Kalimantan Selatan. Bagian daun Langsat (*L. domesticum*) yang digunakan adalah daun segar yang berwarna hijau.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel-variabel yang digunakan pada penelitian ini meliputi :

- a. Variabel bebas : Konsentrasi ekstrak etanol 96% daun Langsat (*Lansium domesticum*).
- b. Variabel terikat : Aktivitas antioksidan yang terkandung pada daun Langsat (*Lansium domesticum*) berupa nilai IC₅₀.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan adalah aluminium foil, ayakan no.40, batang pengaduk, blender, botol kaca gelap, cawan penguap, corong kaca (Pyrex[®]), gelas beaker (Pyrex[®]), gelas ukur (Pyrex[®]), lemari pendingin (Sharp[®]) kuvet, labu ukur (Pyrex[®], Iwaki Glass), mikropipet (Dragon lab[®]), penjepit kayu, pipet tetes, rak tabung, rotary evaporator (1KFR10[®]), sendok tanduk, spektrofotometer UV-Vis, tabung reaksi, timbangan analitik (Ohaus), vial coklat, gojog (JEIO Tech) dan waterbath (Memmert[®]).

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun Langsat (*L. domesticum*), amil alkohol (Emsure®), aquadest (onemed®), asetat anhidrida, DPPH (Merck®), etanol (Onemed®), FeCl₃ (Arkitos®), H₂SO₄, HCl (Merck®), kertas label, kertas perkamen, kertas saring (Whtamann®), kloroform, kuersetin (Sigma aldrich®), metanol p.a dan serbuk Mg (Merck®).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pengambilan daun Langsat (*L. domesticum*)

Daun Langsat sebanyak 2 kg diperoleh dari Desa Surian, Kecamatan Matraman, Kabupaten Banjar, Provinsi Kalimantan Selatan pada bulan Desember tahun 2023. Pengambilan Daun Langsat diperoleh dengan cara memetik bagian daun tua dari tumbuhan Daun Langsat, pemetikan dapat dilakukan dengan menggunakan tangan dan menggunakan alat seperti gunting. Pengambilan Daun Langsat diambil secara acak dengan kriteria daun meliputi : warna daun hijau tua dibandingkan dengan daun muda, tekstur daun sedikit lebih keras, dipanen pada sore hari dengan pertimbangan bahwa pada saat itu metabolit sekunder telah terbentuk sempurna (Julisa, 2016).

3.6.2 Determinasi daun Langsat (*Lansium domesticum*)

Determinasi tumbuhan Daun Langsat (*Lansium domesticum*) dilakukan di Laboratorium Dasar Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lambung Mangkurat. Dengan hasil determinasi dengan nomor :295b/L.B.LABDASAR/XII/2023, menunjukkan bahwa daun langsat yang digunakan adalah *Lansium domesticum corr.*

3.6.3 Pembuatan Simplisia daun Langsat (*Lansium domesticum*)

Daun Langsat (*Lansium domesticum*) terlebih dahulu disortasi basah untuk dibersihkan dari tanah, kotoran dan benda asing yang melekat. Kemudian Daun Langsat (*Lansium domesticum*) ditimbang dan dilakukan pencucian. Selanjutnya dilakukan perajangan lalu dikeringkandengan cara dianginkan serta tidak terkena matahari secara langsung. Proses dilanjutkan dengan sortasi kering dan simplisia kering kemudian dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk dan diayak menggunakan ayakan no. 40 sehingga diperoleh serbuk simplisia, lalu disimpan dalam wadah yang tertutup rapat (Ningsih *et al.*, 2020). Rendemen simplisia dihitung dengan rumus :

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

3.6.4 Pembuatan Ekstrak Etanol daun Langsat (*Lansium domesticum*) dengan Metode Maserasi

Serbuk daun Langsat ditimbang sebanyak 200 g, dimasukkan ke dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan 1 L etanol 96% secara bertahap lalu direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-

sekali diaduk kemudian didiamkan selama 18 jam. Kemudian disaring, ampas yang dihasilkan dimaserasi kembali (remaserasi) sebanyak 2 kali dengan perbandingan jumlah pelarut yang sama. Ekstrak cair yang didapat kemudian dipisahkan dari pelarutnya dengan menggunakan vacuum rotary evaporator pada suhu 40°C, lalu dipekatkan menggunakan waterbath hingga diperoleh ekstrak kental dan didapatkan bobot tetap (Subaryanti, 2022). Ekstrak kental yang didapat dihitung rendemennya dengan rumus :

$$\% \text{Redemen simplisia} = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot serbuk yang digunakan}} \times 100\%$$

3.6.5 Skrining Fitokimia

a. Alkaloid

Ekstrak kental Daun Langsung ditimbang sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan pelarut etanol dalam labu ukur 10 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL HCl 2 N. Larutan dibagi menjadi 3 tabung reaksi, kemudian dimasukkan masing-masing 3 tetes. Tabung pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff, tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer, dan tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi Wagner. Kemudian sampel diamati hingga keruh atau ada endapan jingga, putih, dan coklat menunjukkan adanya alkaloid (Nursafitri, 2020).

b. Fenolik

Ekstrak kental Daun Langsung ditimbang sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan pelarut etanol dalam labu ukur 10 mL, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 3 tetes FeCl_3 5% terjadinya perubahan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam pekat pada ekstrak menandakan bahwa positif mengandung fenolik (Azizah, 2018, Ningsih, 2020).

c. Flavonoid

Ekstrak kental Daun Langsung ditimbang sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan pelarut etanol dalam labu ukur 10 mL, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 10 mL aquadest. Kemudian ditambahkan 1 mL HCl pekat ditambah 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mL amil alkohol kemudian digojog kuat. Reaksi positif jika terjadi perubahan warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Marjoni, 2016, Sulistyarini *et al.*, 2020).

d. Saponin

Ekstrak kental Daun Langsung ditimbang sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan pelarut etanol dalam labu ukur 10 mL, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL aquadest hingga seluruh sampel terendam, dididihkan selama 5 menit, dan selanjutnya didinginkan, kemudian dikocok kuat selama 10 detik hingga muncul buih. Lalu

ditambahkan 1 tetes HCl 2 N untuk mengamati ketahanan buih. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil (Marjoni, 2016, Sulistyarini *et al.*, 2020).

e. Tanin

Ekstrak kental Daun Langsung ditimbang sebanyak sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan pelarut etanol dalam labu ukur 10 mL, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 tetes gelatin 1%. Hasil positif jika perubahan warna menjadi biru kehitaman (Astarina *et al.*, 2013, Arnida, 2021).

3.6.6 Uji Aktivitas Antioksidan ekstrak etanol 96% secara Kuantitatif dengan Metode DPPH

a. Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM

Larutan DPPH 0,1 mM dibuat dengan cara menimbang DPPH sebanyak 7,89 mg dilarutkan dengan 50 mL etanol p.a dalam labu ukur, digojog hingga homogen. Kemudian ditempatkan ke dalam botol gelap (Nursafitri, 2020., Mahmudah, 2021., Anggriwara, 2022).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH 0,1 mM

Sebanyak 1 mL DPPH 0,1 mM dimasukkan ke dalam vial coklat, kemudian ditambahkan 4 mL etanol p.a. Kemudian larutan digojog selama 1 menit hingga campuran homogen dan didiamkan selama 30 menit di tempat gelap. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450-550 nm hingga didapatkan panjang gelombang maksimum (Bakti *et al.*,

2017., Pratiwi, 2020).

c. Pengukuran Blanko DPPH

Pengujian dilakukan dengan menambahkan 1 mL larutan DPPH 0,1 mM ke dalam vial coklat, kemudian ditambahkan 4 mL etanol p.a. Digojog dan diinkubasi pada suhu ruang selama waktu yang diperoleh pada *operating time*. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang diperoleh (Anggriwara, 2020; Nursafitri, 2020).

d. Penentuan *operating time*

Sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,1 mM dimasukkan ke dalam vial coklat kemudian ditambahkan dengan kuersetin 3 ppm sebanyak 4 mL. Setelah itu dihomogenkan dan diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dalam interval waktu 5 menit selama 1 jam. *Operating time* ditentukan saat diperoleh absorbansi yang stabil. (Nursafitri, 2020).

e. Pembuatan larutan pembanding kuersetin

Menimbang sebanyak 25 mg kuersetin lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm dengan etanol p.a dalam labu ukur 25 mL (Anggriwara, 2020).

f. Pengukuran aktivitas antioksidan pembanding kuersetin

Larutan pembanding kuersetin Pengujian dilakukan dengan mengambil 4 mL larutan kuersetin dari berbagai konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm. Kemudian masing-masing ditambahkan 1 mL DPPH 0,1 mM. Kemudian Digojog dan diinkubasi pada suhu ruang selama waktu yang diperoleh pada *operating time*. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang diperoleh sebelumnya dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Anggriwara, 2022; Nursafitri, 2020).

g. Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol Daun Langsung

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan cara menimbang ekstrak etanol daun Langsung sebanyak 25 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a sambil diaduk dan dihomogenkan lalu dicukupkan volumenya hingga 25 mL. Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm dan 150 ppm dengan etanol p.a dalam labu ukur 10 mL hingga tanda batas (Anggriwara, 2020., Nursafitri, 2020).

h. Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Pengujian dilakukan dengan memipet 4 mL larutan sampel dari berbagai konsentrasi 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm dan 125 ppm dan 150 ppm. Kemudian masing-masing ditambahkan 1 mL DPPH 0,1 mM. Kemudian digojog dan diinkubasi pada suhu ruang selama waktu yang diperoleh pada *operating time*. Diukur absorbansinya

pada panjang gelombang yang diperoleh sebelumnya dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Anggriwara, 2020; Nursafitri, 2020).

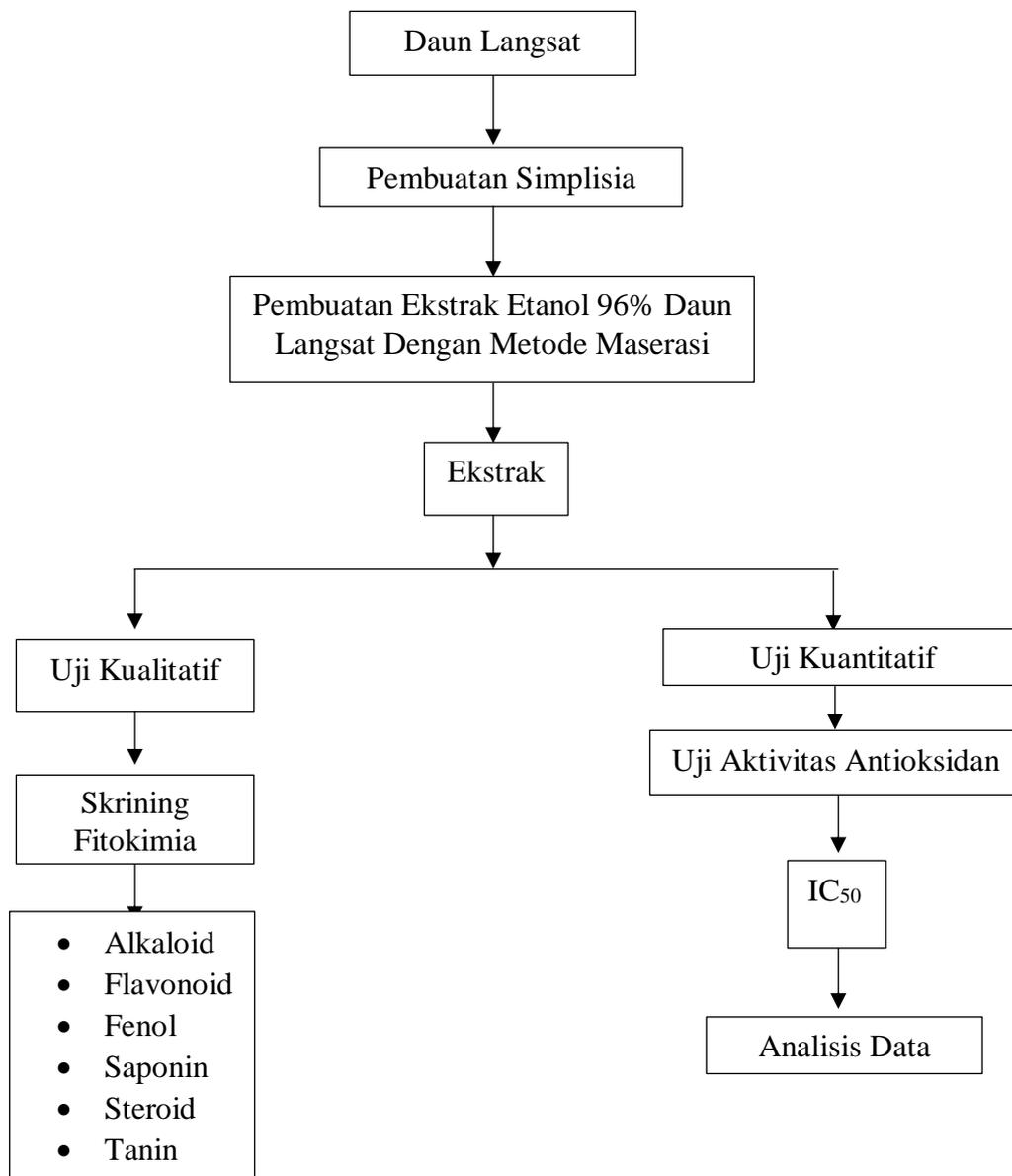
3.7 Analisis Data

Parameter yang bisa digunakan untuk menginterpretasikan hasil dari uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH adalah dengan nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi yang menyebabkan hilangnya 50% aktivitas DPPH. Untuk menghitung nilai IC₅₀ diperlukan data persen inhibisi dari pengujian yang dilakukan. Persen inhibisi dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Konda et al., 2020) :

$$\%INHIBISI = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sample}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Untuk menentukan IC₅₀ diperlukan persamaan kurva standar dari persen inhibisi sebagai sumbu y dan konsentrasi ekstrak antioksidan sebagai sumbu x. IC₅₀ dihitung dengan cara memasukkan nilai 50% ke dalam persamaan kurva standar sebagai y kemudian dihitung nilai x sebagai konsentrasi IC₅₀. Semakin kecil nilai IC₅₀ menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Sari et al., 2020).

3.8 Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian