

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, yaitu bertujuan untuk menguji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun bamban *Donax canniformis* (G. Forst) K. Schum. Dengan metode maserasi.

3.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Borneo Lestari Banjarbaru Kalimantan Selatan. Waktu pelaksanaan penelitian dilakukan dari bulan Desember 2021 hingga Mei 2022.

3.3 Variable Penelitian

3.3.1 Variable Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang menjadi penyebab atau memiliki kemungkinan teoritis berdampak pada variabel lain. Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi pelarut ekstrak etanol *Donax canniformis* (G. Forst) K. Schum.

3.3.2 Variable Terkait

Variabel terkait adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel terkait penelitian ini adalah nilai IC₅₀.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah bejana maserasi, seperangkat alat refluks, neraca analitik (*OHAUS®*), spektrofotometer UV-Vis (*T70t®*), rotary evaporator (*pyrex®*), alat-alat kaca (*iwaki®pyrex®*) dan vortex serta waterbath.

3.4.2 Bahan

Bahan uji yang digunakan adalah daun kemangi yang telah dikeringkan dan dihaluskan. Bahan yang digunakan antara lain asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, besi (III) klorida 1%, DPPH, etanol 70%, HCl 2%, HCl 2 N, methanol, Mg, reagen Bouchardat, Reagen Mayer, Reagen Wagner, kuarsetin

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengumpulan Daun

Sampel daun bamban yang digunakan diperoleh dari daerah Martapura, Kabupaten Banjar, Provinsi Kalimantan Selatan. Bagian yang diambil bagian daun yang sudah matang.

3.5.2 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman Bamban *Donax canniformis* (*G. Forst*) *K. Schum.* Dilakukan di Laboratorium Dasar FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru, Kalimantan Selatan

3.5.3 Pembuatan Simplisia

Pengumpulan daun bamban. Daun yang di ambil adalah daun yang sudah matang, daun bamban yang dikumpulkan disortasi basah

untuk memisahkan kotoran mikroba atau bahan asing dari tanah, kerikil, batang dan akar yang seharusnya dibuang. Pencucian dilakukan dengan air bersih mengalir untuk membersihkan dan menghilangkan tanah. Dilakukan perajangan untuk memperkecil ukuran simplisia. Pengeringan daun kemangi dapat dilakukan secara alami dengan bantuan sinar matahari langsung. Setelah kering dihaluskan menggunakan *blender* agar menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40, simplisia kering dimasukkan ke dalam wadah tertutup rapat, kemudian dilakukan perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah.

$$\%Rendamen\ Simplisia = \frac{Bobot\ simplisia\ (akhir)}{Bobot\ Simplisia\ (awal)} \times 100\%$$

3.5.4 Pembuatan Ekstrak Etanol 70% *Donax canniformis* (G. Forst) K.

Schum.

Masing-masing serbuk simplisia ditimbang 500 gram dimasukkan dalam toples yang berbeda, ditambah cairan penyari yaitu etanol 70% sebanyak 3,5 L, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk sehari minimal 3 kali. Setelah 5 hari, campuran simplisia dan etanol 70% diserkai sehingga diperoleh filtrat (maserat) I. Ampas ditambah etanol 70% sebanyak 1,5 L kemudian ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari, campuran ampas dan etanol 70% diserkai kembali dan diperoleh filtrat (maserat) II. Filtrat I

dan II kemudian dicampur dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 45°C sampai diperoleh ekstrak kental etanol (Wicaksono & Ulfah 2017).

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat}}{\text{Bobot serbuk yang diekstraksi}} \times 100\%$$

3.5.5 Skrining Fitokimia

a. Uji Flavonoid

Sampel ditimbang 0,5 gram, masukkan kedalam tabung reaksi tambahkan 1 gram Mg dan larutan HCl pekat. Adanya flavonoid ditandai dengan berubahnya warna larutan menjadi merah muda/jingga (Noviyanty & Linda, 2020).

b. Uji Fenol

Sampel 0,1 gram di larutkan dengan metanol. Larutan yang dihasilkan diambil sebanyak 1 ml, tambahkan 2 tetes FeCl₃ 5%. Adanya senyawa fenol ditandai dengan terbentuknya warna hijau atau hijau kebiruan (Nugrahani *et al.*, 2016).

c. Uji Alkaloid

Ambil ekstrak 0,5 gram tambahkan HCL 1% kemudian saring. Filtrat dibagi menjadi dua bagian dan dilakukan pengujian menggunakan pereaksi wagner dan dragendorf. Senyawa Alkaloid ditandai dengan adanya endapan kuning dengan pereaksi wagner. Terbentuk endapan orange pada penambahan pereaksi dragendorf menunjukkan positif mengandung alkaloid (Kumoro, 2015)

d. Uji Steroid

Sampel 0,5 gram di tempatkan pada plat tetes ditambahkan asam asetat (CH_3COOH) sampai terendam semuanya, diamkan 15 menit. Ambil larutan sebanyak 6 tetes masukkan dalam tabung reaksi, tambahkan 2-3 tetes asam sulfat (H_2SO_4). Adanya senyawa steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru (Noviyanty & Linda, 2020).

e. Uji Tanin

Uji tannin menggunakan uji gelatin, sampel diambil sebanyak 0,125 g dilarutkan dalam 25 ml pelarutnya kemudian disaring, ambil sebanyak 2 mL sampel kemudian tambahkan larutan gelatin 1 % dan NaCl 10% jika sedimen putih terbentuk, ini menandakan keberadaan tannin (Setiabudi & Tukiran, 2017).

f. Uji Triterpenoid

Sampel 0,5 gram dimasukkan kedalam tabung, ditambahkan asam asetat (CH_3COOH) glasial dan 1 ml larutan asam sulfat (H_2SO_4) pekat. Adanya senyawa terpenoid ditandai dengan berubah nya warna menjadi merah (Noviyanty & Linda, 2020).

3.5.6 Uji Kuantitatif Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bamban

(Donax Canniformis (G. Forst) K. Sehum.) Menggunakan

Spektrometri UV-Vis

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,4 Mm

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 7,886 mg, kemudian dilarutkan di dalam 50 ml methanol p.a, sehingga didapatkan konsentrasi larutan DPPH 0,4 mM yang dihitung terhadap BM DPPH sebesar 394,32 g/mol larutan, kemudian larutan ditempatkan didalam botol gelap (Putri *et al.*, 2019).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH 0,4 Mm

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan dibuat larutan pereaksi DPPH 0,4 mM dilakukan dengan cara memasukan 1,0 mL larutan DPPH ke dalam pereaksi dan di tambahkan 4 mL metanol p.a kemudian dibungkus dengan aluminium foil setelah itu dihomogenkan. Selanjutnya dimasukan kedalam kuvet dan absorbansinya diukur menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang diukur 500-600 nm (Putri *et al.*, 2019).

c. Penentuan *Operating Time*

Larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 ml ditambahkan dengan larutan standar kuersetin 3 ppm sebanyak 4 ml. Selanjutnya larutan larutan serapan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah

ditetapkan dengan interval waktu 5 menit sampai mencapai absorbansinya yang stabil (Putri *et al.*, 2019).

d. Pembuatan Larutan Blanko DPPH 0,4 Mm

Larutan blanko DPPH 0,4 mm yang telah dibuat diambil 1,0 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 4 ml metanol kemudian dibungkus dengan aluminium foil lalu dihomogenkan. Proses inkubasi dilakukan di ruangan gelap terhindar cahaya matahari selama *oprating time* yang telah ditetapkan sebelumnya. Selanjutnya larutan blanko DPPH dimasukkan ke dalam kuvet. Serapan diukur menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan sebelumnya (Putri *et al.*, 2019).

e. Pembuatan Larutan Pembanding Kuarsetin

Larutan seri dibuat dengan menggunakan kuarsetin 100 mg kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 ml, lalu ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas dan gojok sampai homogeny. Sehingga konsentrasi kuarsetin menjadi 1000 ppm. Seri konsentrasi dibuat dengan cara mengambil 250 μ L, 500 μ L, 750 μ L, 1000 μ L dan 1.250 μ L dilarutkan dalam 25 ml pelarut metanol, didapatkan konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm (Khairiah *et al.*, 2018)

**f. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Etanol Daun Bamban
(*Donax Canniformis* (G. Forst) K. Sehum.)**

Larutan uji yang dibuat berupa ekstrak metanol p.a Bamban (*Donax Canniformis* (G. Forst) K. Sehum.) 100 mg, lalu dimasukan kedalam labu ukur 100 ml, lalu ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas dan gojok sampai homogeny. Hingga didapatkan konsentrasi larutan induk 1000 ppm. Larutan induk dibuat 5 seri konsentrasi dengan cara mengambil 1,250 μ L, 1.875 μ L, 2,5 μ L, 3,125 μ L dan 3,75 μ L dilarutkan dalam 25 ml pelarut metanol, didapatkan konsentrasi yaitu 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm dan 150 ppm (Khairiah *et al.*, 2018).

3.6 Pengolahan Data

Hasil pengukuran absorbansi yang didapat dari Spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk menghitung aktivitas antioksidan. Aktivitas penangkal radikal diekspresikan sebagai persentase inhibisi yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi radikal DPPH} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Setelah didapatkan persentasi peredaman dari konsentrasi larutan uji dan kuersetin, kemudian ditentukan persamaan $y = Bx - A$ dengan perhitungan secara regresi linear dimana x adalah konsentrasi (ppm) dan y

adalah presentase inhibisi DPPH (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition concentration 50%* (IC50) yaitu jika konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC50 didapatkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50 (Cahyani, 2017). Kategori antioksidan dapat dilihat dari tab berikut (Bahriul et al., 2014)

Kategori antioksidan dapat dilihat dari tabel berikut (Bahriul et al., 2014)

Tabel 2. Klasifikasi aktivitas antioksidan berdasarkan nilai IC₅₀

Besaran IC ₅₀	Kategori
<50 ppm	Sangat Kuat
50-100 ppm	Kuat
100-150 ppm	Sedang
150-200	Lemah
>200 ppm	Sangat Lemah