

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Riset ini menggunakan metode eksperimental menggunakan fraksi n-heksan dan etil asetat daun mangga (*Mangifera indica* L.) untuk mengukur aktivitas penghambatan xantin oksidase. Tahap-tahap yang dilakukan dalam riset ini yaitu, pembuatan simplisia, pembuatan ekstrak, pembuatan fraksi, identifikasi senyawa, dan pengujian menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk melihat IC₅₀ dari fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat daun mangga (*Mangifera indica* L.). Absorbansi yang diperoleh untuk menghitung persen aktivitas penghambatan xantin oksidase yang kemudian dilanjutkan dengan analisis regresi linier untuk memperoleh nilai IC₅₀.

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Daun mangga (*Mangifera indica* L.) yang diambil dari daerah Samarinda, Kalimantan Timur.

2. Objek Penelitian

Aktivitas penghambatan xantin oksidase.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Riset ini dilaksanakan pada Desember 2021 hingga April 2022 pada Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Laboratorium Kimia, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

D. Definisi Operasional

1. Definisi Operasional

a. Metabolit sekunder merupakan senyawa organik yang terdapat pada tumbuhan dan merupakan sumber senyawa obat seperti alkaloid, terpenoid, saponin, steroid, tanin dan flavonoid.

- b. Nilai IC_{50} uji hambat xantin oksidase merupakan nilai yang menggambarkan besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat menghambat aktivitas enzim 50%. Semakin kecil IC_{50} maka semakin tinggi aktivitas penghambatan xantin oksidase yang terjadi.
- c. Ekstrak adalah suatu sediaan yang dibuat dengan menyari simplisia, diluar dari pengaruh cahaya matahari.
- d. Fraksi merupakan hasil dari proses fraksinasi atau menarik suatu senyawa dalam sebuah ekstrak dengan lebih dari satu macam jenis pelarut dengan catatan berbeda polaritas.
- e. Xantin oksidase adalah suatu enzim yang mengkatalisasi oksidasi hipoxantin jadi xantin dan selanjutnya dapat mengkatalisasi oksidasi xantin jadi asam urat.
- f. Hiperurisemia ialah keadaan dimana jumlah asam urat yang tinggi di dalam darah.

2. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas
Perbandingan konsentrasi fraksi n-heksan dan etil asetat daun mangga (*Mangifera indica* L.) menggunakan spektrofotometri UV-Vis.
- b. Variabel terikat
Aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase.

E. Instrumen Penelitian

1. Bahan Penelitian

Daun mangga (*Mangifera indica* L.), allopurinol, metanol, pelarut n-heksan, pelarut etil asetat, aquadest, aquadest bebas CO_2 , pereaksi dragendroff, mayer, wagner, besi (III) Klorida 1%, HCl 1N, HCl 2N, NaCl, Serbuk magnesium, $CHCl_3$, NaOH 1N, Pereaksi Lieberman Burchard, NaOH 1 M, larutan dapar fosfat 0,05 M, enzim xantin

oksidase (Sigma X1875 UN), amonium sulfat, substrat xantin (Sigma X0626-56).

2. Alat Penelitian

Cawan porselen, gelas ukur iwaki, corong pisah pyrex, corong kaca iwaki, gelas beaker iwaki, penangas air faithful, thermometer yenaco, pipet mikro 100-1000 μ L scilogex, spektrofotometer UV-Vis *Thermo scientific genesys 10S UV-VIS*, kuvet kuarsa, *rotary vakum evaporator* Buchi R-100, tabung reaksi iwaki, rak tabung reaksi, kertas saring, erlenmeyer pyrex, neraca analitik Fujitsu FSR B1200 pipet tetes Onelab dan labu ukur iwaki.

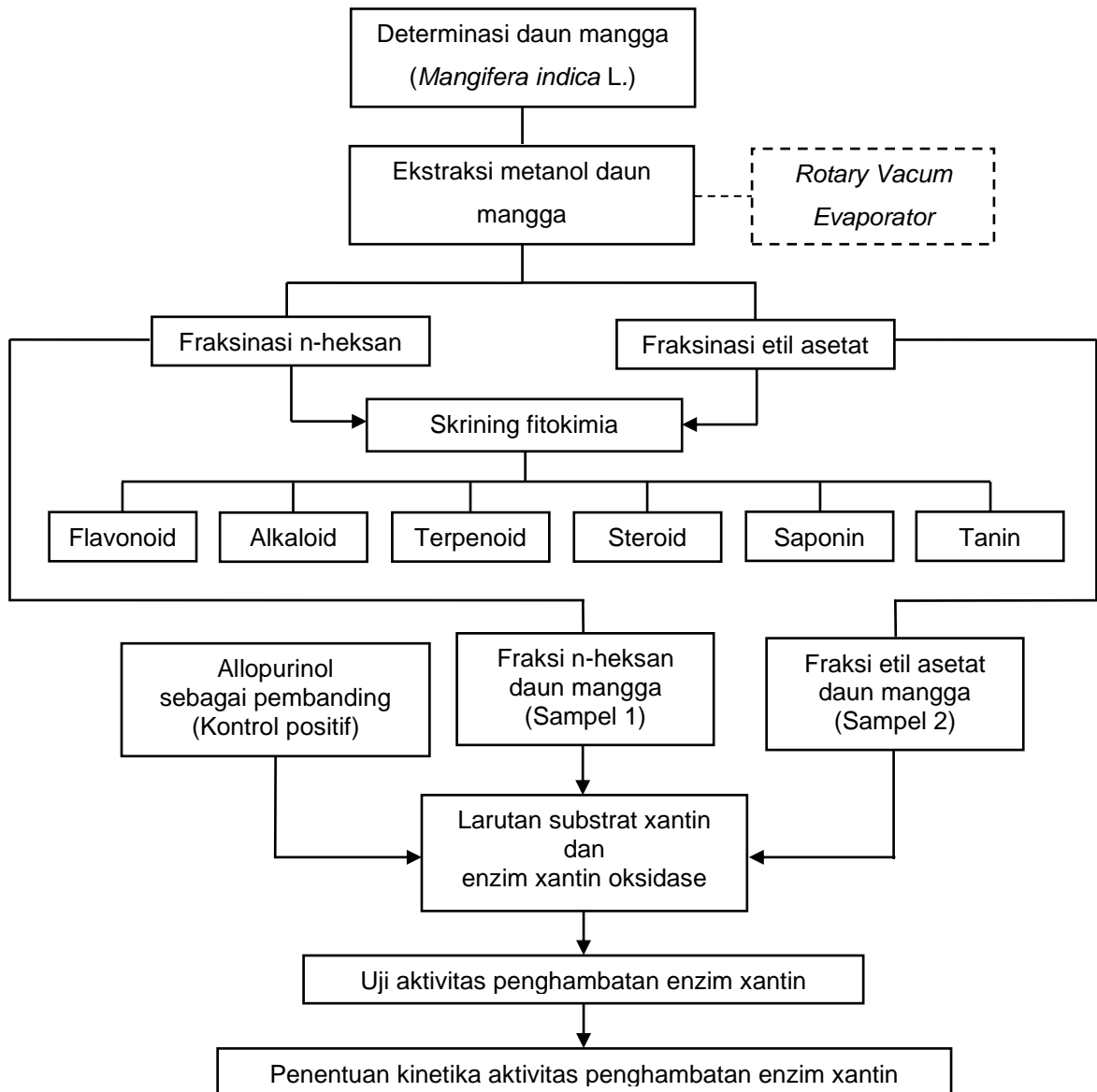
F. Metode Penelitian

Riset ini menggunakan metode eksperimental secara in-vitro dengan melakukan pengujian sampel fraksinasi diluar dari tubuh makhluk hidup. Dalam pengukuran aktivitas enzim xantin oksidase dilakukan dengan menggunakan perbandingan fraksinasi n-heksan dan etil asetat daun mangga (*Mangifera indica* L.) menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan melakukan analisis regresi linier untuk mendapatkan nilai IC₅₀.

G. Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh untuk menentukan nilai IC₅₀ adalah persen inhibisi dan konsentrasi sampel. Dilakukan perhitungan persamaan regresi linier $y = a + b(x)$, melalui microsofft excel, membuat hubungan antara konsentrasi senyawa (x) dengan aktivitas penghambat enzim xantin oksidase (y) dari seri replika pengukuran guna mengetahui nilai IC₅₀ pada masing-masing sampel, setelah itu ditetapkan bahwa persamaan variabel (y) dengan ketetapan nilai 50 dan (x) merupakan nilai IC₅₀ yang akan diperoleh.

H. Alur Jalannya Penelitian

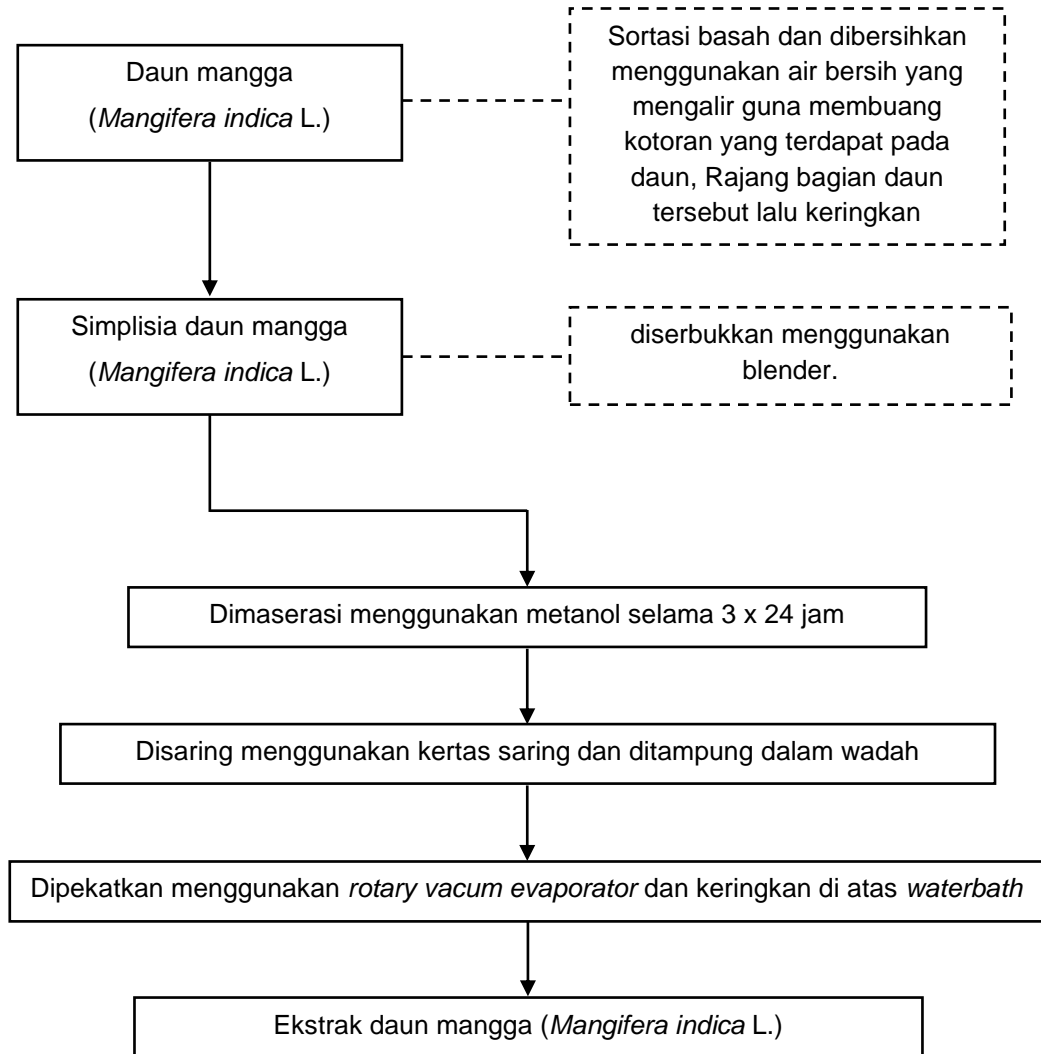


Gambar 3.1 Alur Jalannya Penelitian

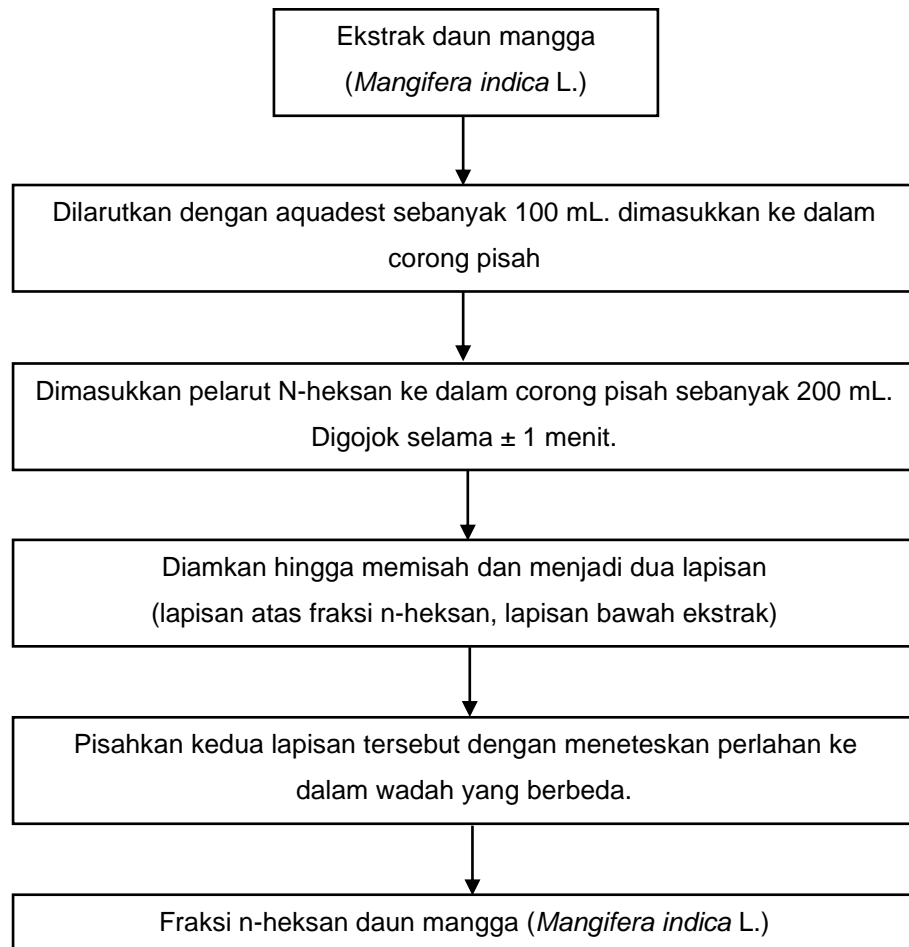
1. Pengambilan Sampel

Determinasi daun mangga (*Mangifera indica* L.) dilakukan di Samarinda, Kalimantan Timur.

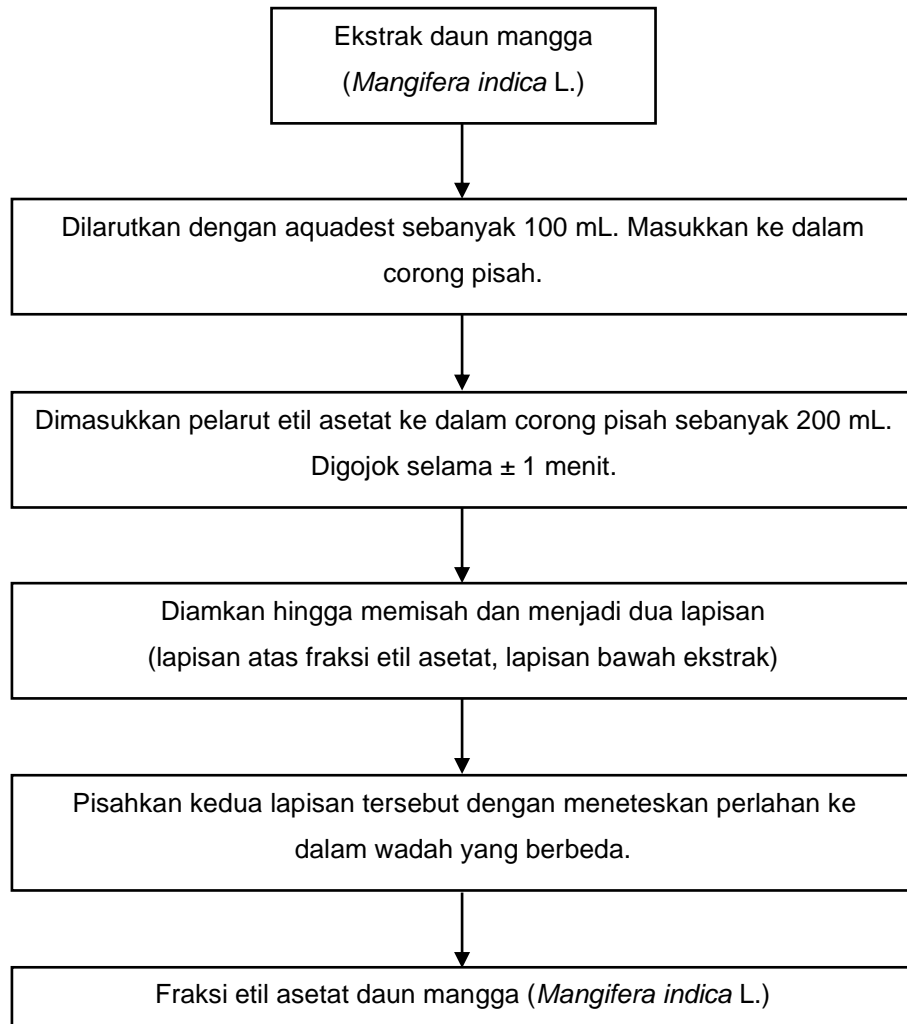
a. Pembuatan Ekstrak Daun Mangga (*Mangifera indica* L.)



Gambar 3.2 Pembuatan Ekstrak Daun Mangga

b. Pembuatan Fraksi N-heksan Daun Mangga (*Mangifera indica* L.)

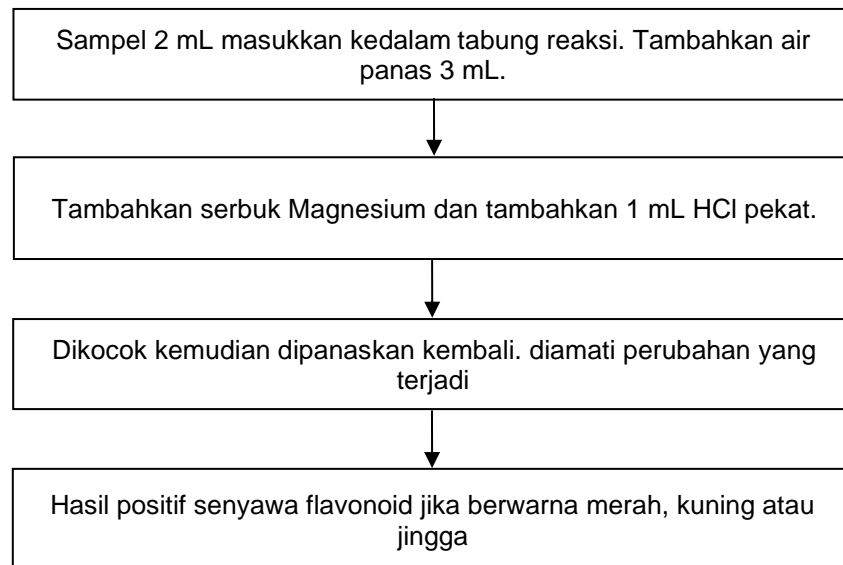
Gambar 3.3 Pembuatan Fraksi N-heksan Daun Mangga

c. Pembuatan Fraksi Etil Asetat Daun Mangga (*Mangifera indica* L.)

Gambar 3.4 Pembuatan Fraksi Etil Asetat Daun Mangga

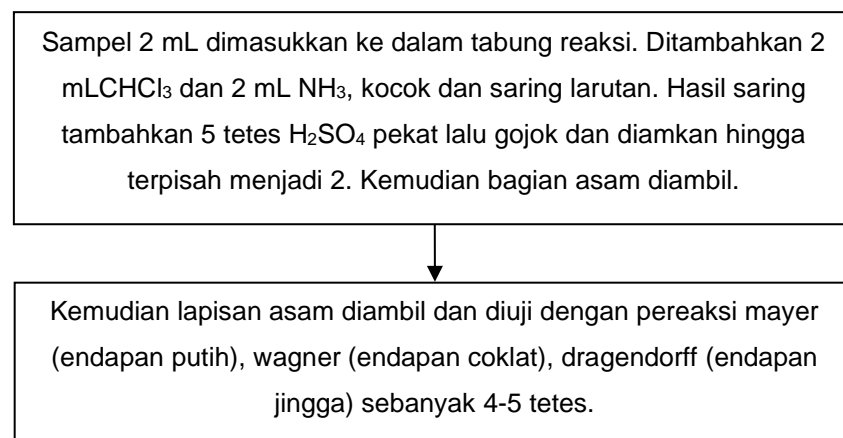
2. Skrining Fitokimia

a. Uji Flavonoid



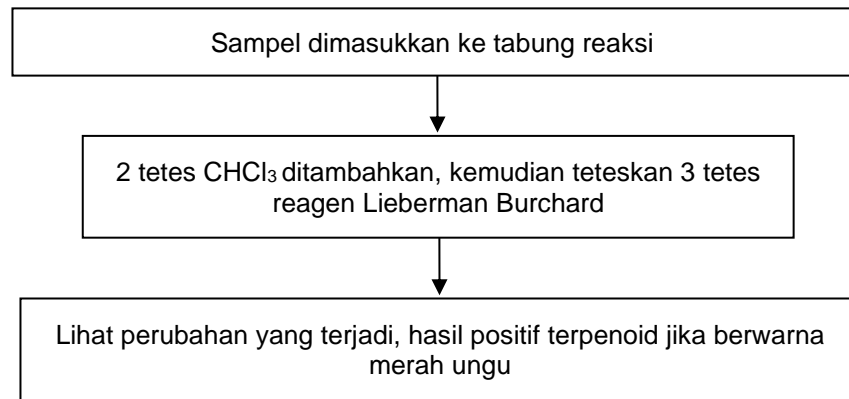
Gambar 3.5 Uji Flavonoid

b. Uji Alkaloid



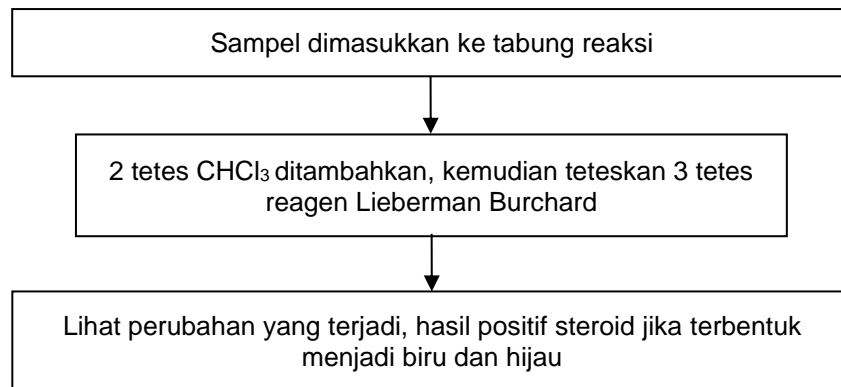
Gambar 3.6 Uji Alkaloid

c. Uji Terpenoid



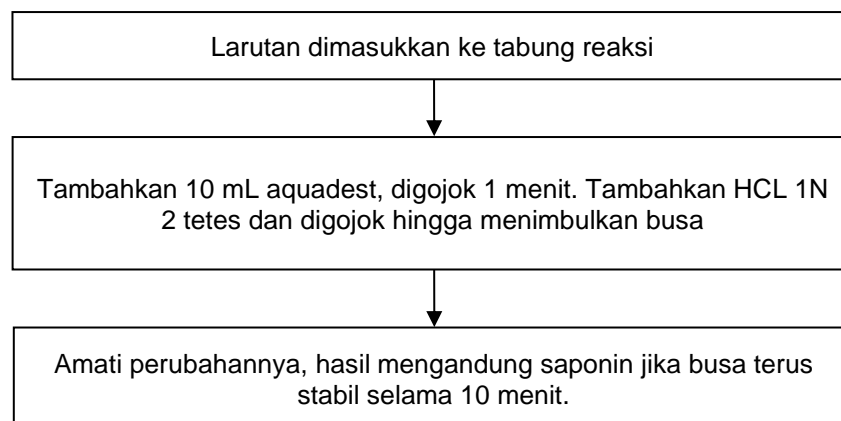
Gambar 3.7 Uji Terpenoid

d. Uji Steroid



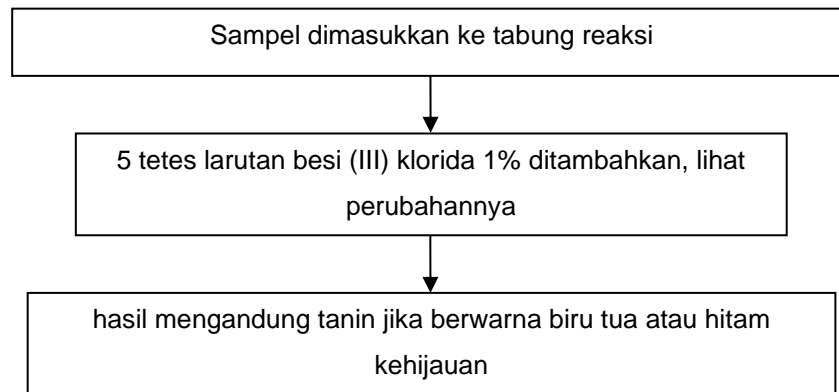
Gambar 3.8 Uji Steroid

e. Uji Saponin



Gambar 3.9 Uji Saponin

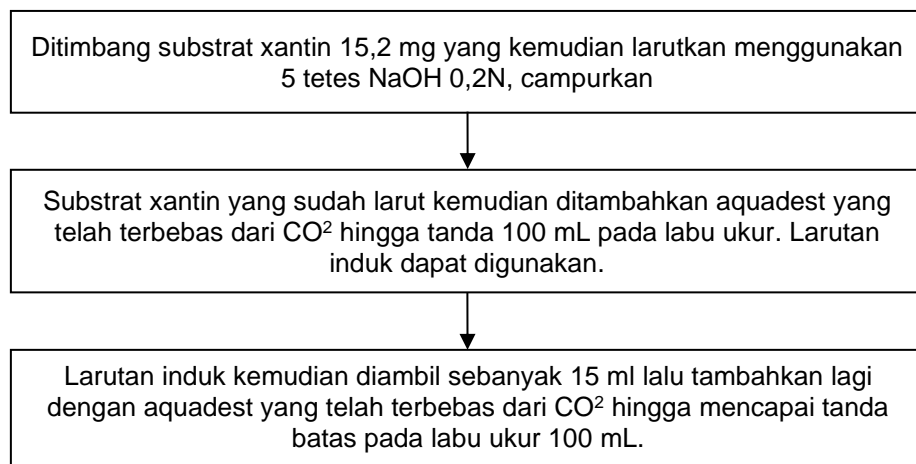
f. Uji Tanin



Gambar 3.10 Uji Tanin

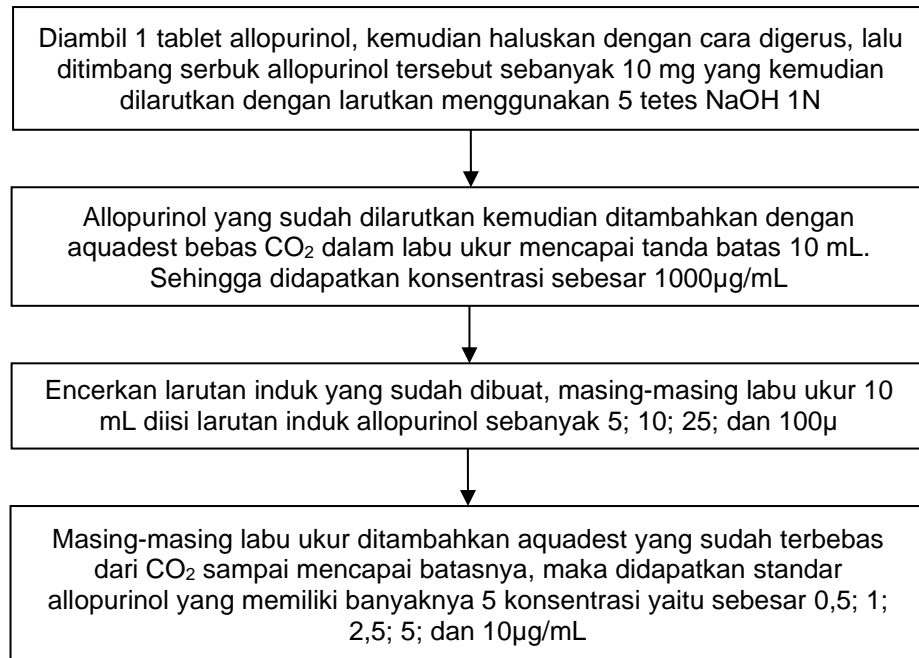
3. Penyiapan Larutan

a. Membuat Larutan Substrat Xantin



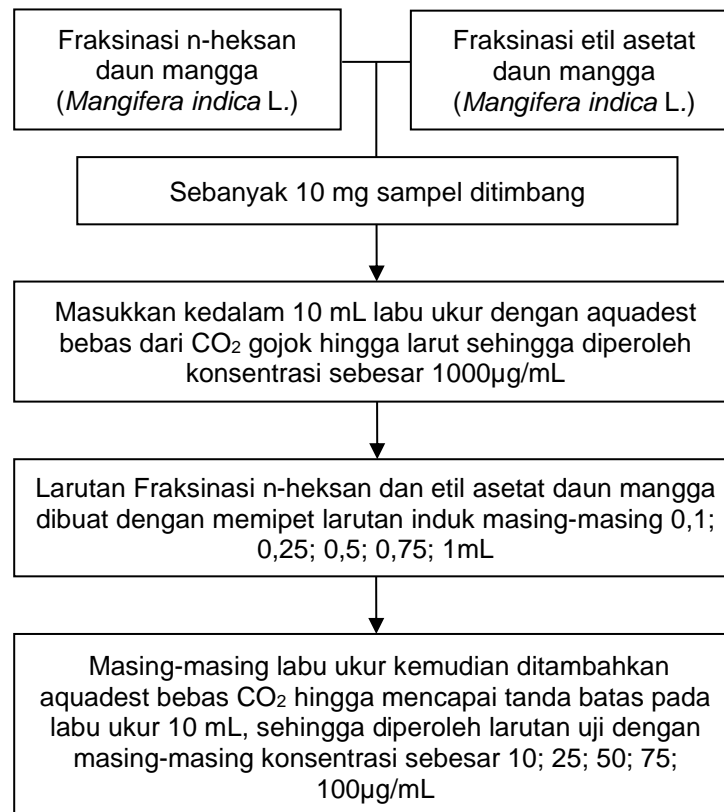
Gambar 3.11 Pembuatan Larutan Substrat Xantin

b. Pembuatan Larutan Allopurinol



Gambar 3.12 Pembuatan Larutan Allopurinol

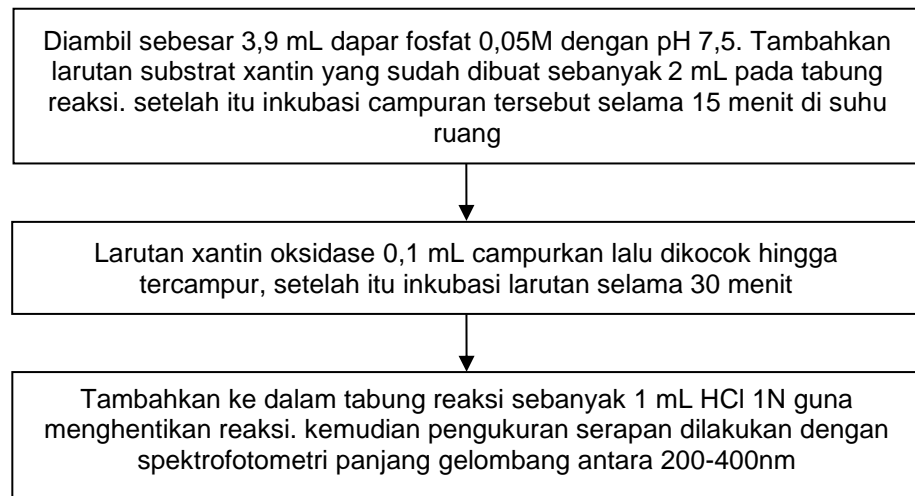
c. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Sampel Fraksinasi N-heksan dan Etil Asetat Daun Mangga (*Mangifera indica* L.)



Gambar 3.13 Pembuatan Larutan Uji Sampel

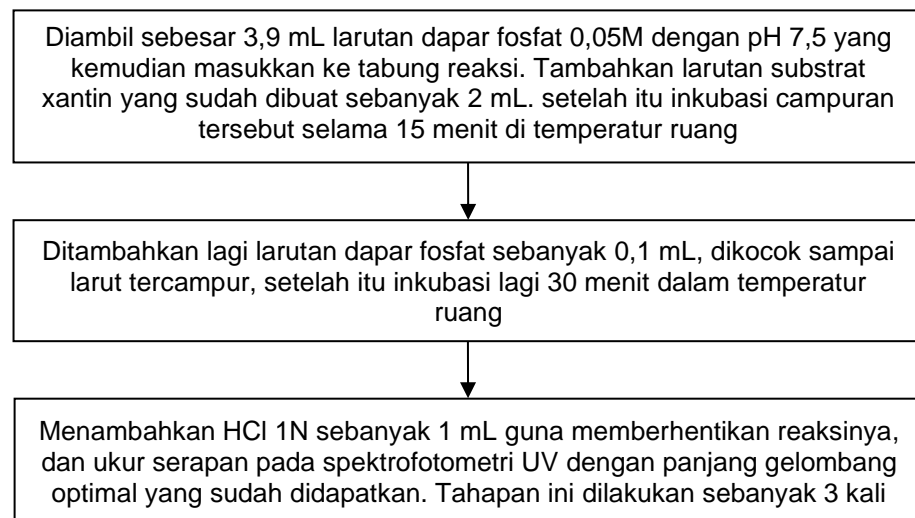
4. Pengujian Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase

a. Penentuan Optimasi Panjang Gelombang Maksimum



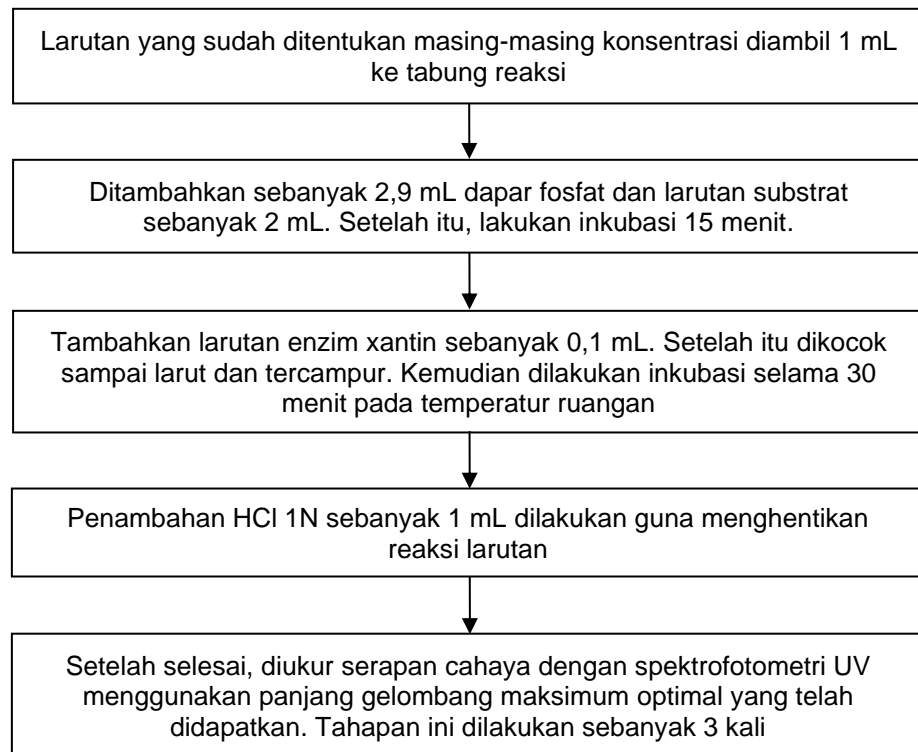
Gambar 3.14 Penentuan Panjang Gelombang

b. Uji Inhibisi Kontrol Blanko



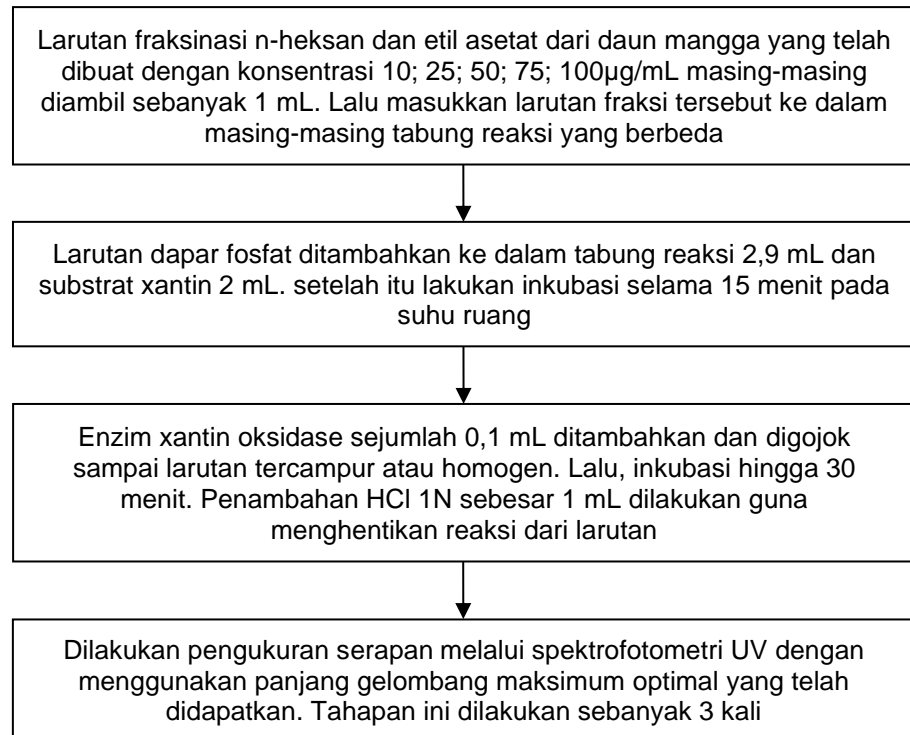
Gambar 3.15 Uji Efek Inhibisi Kontrol Blanko

c. Uji Inhibisi Larutan Standar Allopurinol



Gambar 3.16 Uji Inhibisi Allopurinol

d. Pengujian Efek Inhibisi Larutan Sampel



Gambar 3.17 Uji Inhibisi Sampel

e. Perhitungan

Perhitungan %inhibisi enzim xantin oksidase untuk mengukur seberapa besar kemampuan suatu tanaman untuk menghambat kerja enzim xantin oksidase. Hal tersebut dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

A : Absorbansi kontrol blanko

B : Rerata Absorbansi sampel

Penentuan Nilai IC_{50} :

Perhitungan menggunakan rumus persamaan regresi linier $y=a+b(x)$. Konsentrasi sampel 50% merupakan aktivitas inhibisi dan nilai IC_{50} diperoleh dari nilai (x) dan untuk ketetapan nilai (y) adalah 50.

