

BAB III

METODE PENELITIAN

A. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian yang dilakukan ini adalah penelitian *quantitative* (kuantitatif) dengan menggunakan metode eksperimental di laboratorium menggunakan simplisia daun kelakai dan ekstrak etanol daun kelakai. Tahapan-tahapan penelitian ini meliputi pengumpulan tanaman, determinasi tanaman, pengolahan simplisia, karakterisasi simplisia, pembuatan ekstrak sampel, dan pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl*) sebagai radikal bebas dan nilai absorbansi DPPH diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada rentang *wavelength* 515 – 520 nanometer.

B. SUBJEK DAN OBJEK PENELITIAN

1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan adalah daun kelakai yang diperoleh dari Dusun Handil 2, Kecamatan Muara Jawa, Kabupaten Kutai Kartanegara., Provinsi Kalimantan Timur.

2. Objek Penelitian

Objek pada penelitian ini yaitu karakteristik simplisia kelakai meliputi pengujian organoleptik, *shrinkage drying* (susut pengeringan), bobot jenis, kadar air dan kadar abu serta mengetahui kategori nilai IC_{50} dari ekstrak etanol daun kelakai.

C. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2021 sampai dengan Juni 2022 yang dilaksanakan di Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur. Determinasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Ekologi, Fakultas Kehutanan, Universitas Mulawarman.

D. DEFINISI OPERASIONAL

1. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas yaitu simplisia daun kelakai dan ekstrak etanol daun kelakai.
- b. Variabel terikat yaitu karakteristik simplisia dan kategori nilai IC_{50} aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kelakai.

2. Definisi Operasional

- a. Simplisia merupakan bahan alam yang belum diolah menjadi apapun dan dapat digunakan sebagai obat, biasanya adalah bahan yang sudah dilakukan pengeringan (Ditjen POM, 2000).
- b. Ekstrak adalah suatu bahandengan konsistensi kental yang didapatkan dengan melakukan penarikan senyawa aktif dari bahan (simplisia) tumbuhan atau bahan (simplisia) dari hewan & menggunakan zat pendispersi yang sesuai. Setelah itu hampir semua atau seluruh pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku standar yang telah ditetapkan (Ditjen POM, 1979).
- c. Proses penarikan kandungan kimia pada simplisia dengan menggunakan zat pendispersi serta beberapa kali dilakukan pengadukan pada suhu ruangan (kamar). Remaserasi adalah melakukan maserasi secara berulang dengan menambahkan zat pendispersi setelah proses penyaringan pertama, kedua dan seterusnya. Zat pendispersi yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol teknis 96% dan akan di maserasi selama 3 hari untuk mendapatkan hasil yang maksimal. Hasil maserasi akan diuapkan sebagian pelarut menggunakan *rotary evaporator* setelah itu dipekatkan diatas penangas air hingga didapatkan ekstrak kental (Syamsul *et al.*, 2019).

E. INSTRUMEN PENELITIAN

1. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia daun kelakai, ekstrak etanol p.a 96% daun kelakai, etanol 96%, vitamin C, DPPH (*2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl*), magnesium, HCl pekat, NaCl, FeCl₃, kloroform, ammonia, pereaksi Dragendorff, Mayeer, dan Waggner.

2. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah gelas ukur (*Pyrex*), labu ukur, Erlenmeyer, pipet ukur, mikropipet, botol timbang, mortir dan *stamper*, cawan porselen, krus silikat, batang pengaduk, tabung reaksi, mikroskop, penangas air, timbangan digital, oven, *Moisture balance*, *rotary evaporator*, dan spektrofotometer UV-Visible.

F. METODE PENGUMPULAN DATA

Metode pengumpulan data pada penelitian ini antara lain :

1. Studi Kepustakaan

Studi kepustakaan dengan melakukan penelaahan yang dapat digunakan sebagai dasar panduan dan pedoman serta perbandingan terhadap buku, literatur, catatan, jurnal, artikel maupun karya ilmiah sebagai bahan perbandingan dalam penelitian masalah yang ingin dipecahkan.

2. Metode Eksperimen

Metode yang dilakukan dengan tujuan mengetahui proses atau tahapan karakterisasi simplisia dan uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kelakai yang dilaksanakan di Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Laboratorium Kimia, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

G. TEKNIK ANALISIS DATA

Data yang diperoleh untuk menentukan % inhibisi atau nilai IC₅₀ (*Inhibition Concentration*) dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorban Blangko} - \text{Absorban Sampel}}{\text{Absorban Blangko}} \times 100\%$$

Setelah diketahui % inhibisi dari setiap konsentrasi yang digunakan, konsentrasi sampel dan % *inhibition* yang dimasukkan masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear $y = a \pm bx$. Nilai IC₅₀ diperoleh setelah melakukan substitusi nilai y dengan 50 dan mengubah nilai x menjadi hasil IC₅₀.

Perhitungan nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI) digunakan untuk menentukan atau mengelompokkan aktivitas antioksidan suatu sampel dengan menggunakan rumus :

$$\text{Nilai AAI} = \frac{\text{Konsentrasi DPPH (ppm)}}{\text{IC}_{50} \text{ Sampel (ppm)}}$$

Menurut Faustino *et al.*, (2010) aktivitas antioksidan berdasarkan nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI) dikatakan lemah jika < 0,5; dikatakan sedang jika 0,5 < atau ≤ 1,0; dikatakan kuat jika 1,0 < atau ≤ 2,0 dan dikatakan sangat kuat jika nilai > 2,0.

H. ALUR JALANNYA PENELITIAN

1. Penyiapan Bahan Tumbuhan

a. Pengumpulan Tanaman

Pengumpulan tanaman dilakukan tanpa melakukan perbandingan terhadap tanaman yang sama dari daerah lain. Tumbuhan kelakai diambil dari Dusun Handil 2, Kecamatan Muara Jawa, Kabupaten Kutai Kartanegara, Kalimantan Timur.

b. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran terkait bahan yang akan digunakan dan menghindari kesalahan dalam mengumpulkan bahan penelitian. Determinasi tumbuhan

dilakukan di Laboratorium Ekologi, Fakultas Kehutanan, Universitas Mulawarman.

c. Pengolahan Bahan Tanaman

Bahan yang digunakan adalah daun kelakai muda yang berwarna coklat kemerahan. Daun kelakai yang telah diambil kemudian ditimbang, ditandai sebagai berat awal. Kemudian daun dilakukan sortasi basah yang bertujuan untuk memisahkan kotoran maupun bahan asing lain serta bagian tanaman lain yang tidak diinginkan. Setelah itu daun kelakai dicuci pada air mengalir, kemudian ditiriskan. Daun yang telah ditiriskan kemudian dipotong kecil-kecil untuk mempermudah dan mempercepat proses pengeringan. Pengeringan dilakukan dibawah sinar matahari sampai benar-benar kering. Setelah itu dilakukan sortasi kering yang bertujuan untuk memastikan bahwa tidak terdapat kotoran dan zat pengotor lain pada simplisia daun kelakai (*Stenochlaena palustris* Bedd)..Setelah itu simplisia diblender sampai halus hingga menjadi serbuk.Simplisia kemudian ditimbang dan ditandai sebagai berat akhir dan disimpan pada wadah plastik atau kaca, ditutup dengan rapat untuk menghindari kontaminasi bakteri maupun udara.

2. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kelakai

Pembuatan ekstrak etanol daun kelakai dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi adalah metode ekstraksi dengan merendam sampel dalam zat pendispersi yang sesuai dan dalam waktu yang sesuai dengan atau tanpa proses pemanasan (Jamshidi *et al.*, 2014). Simplisia daun kelakai yang telah diblender ditimbang sebanyak 300.60 gram, tambahkan etanol 96% 96% sebanyak 1 L. Simplisia kemudian dimasukkan kedalam wadah dan dimaserasi selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Setelah itu dilakukan remaserasi selama 24 jam dengan menggunakan pelarut baru. Sampel kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sampai hilang sebagian pelarut.

Setelah itu diletakkan diatas penangas air hingga didapatkan ekstrak kental (Jamshidi *et al.*, 2014).

3. Pembuatan Pereaksi

a. Pereaksi Mayeer

Ditimbang 1,36 gr HgCl_2 , kemudian dilarutkan dengan 60 mL aquadest. Pada wadah lain, sebanyak 5 gr KI ditimbang, dilarutkan kedalam 10 mL aquadest. Kedua larutan ini dicampurkan setelah itu dilarutkan dengan zat pendispersi aquades, dicukupkan *ad* 100 mL. Larutan ini harus disimpan dalam botol coklat untuk menghindari kerusakan akibat cahaya langsung.

b. Pereaksi Dragendorff

Ditimbang KI sebanyak 8 gr, kemudian larutkan dalam 20 mL aquadest. Pada bagian lain ditimbang bismuth subnitrat sebanyak 0,85 gr, larutkan pada 10 mL asam asetat dan 40 mL aquadest. Kedua larutan kemudian dicampurkan dan disimpan dalam botol berwarna coklat.

c. Pereaksi Waggner

Ditimbang 1,27 gr I_2 dan 2 gr KI dilarutkan dalam 5 mL aquadest. Kemudian keduanya dilarutkan dengan zat pendispersi aquadest sampai 100 mL. Setelah terbentuk endapan kemudian disaring dan disimpan dalam botol berwarna coklat.

4. Karakterisasi Simplisia

a. Pengujian Organoleptik

Simplisia kelakai yang telah dikeringkan dilakukan uji organoleptik dengan menggunakan lima indera dengan memperhatikan bentuk, rasa, warna, dan bau simplisia.

b. Susut Pengeringan

Simplisia kelakai ditimbang sebanyak 10 gr. Kemudian dimasukkan kedalam *plate moisture balance* yang telah ditara. Setelah itu keringkan pada suhu 105°C hingga alat berbunyi atau hingga berat konstan. Persentase *drying shrinkage* dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{bobot ekstrak kering (gr)}}{\text{bobot ekstrak basah (gr)}} \times 100\%$$

c. Bobot Jenis

Timbang piknometer kosong, kemudian piknometer diisi dengan aquadest dan ditimbang. Keluarkan aquadest dan keringkan piknometer. Masukkan ekstrak daun kelakai kedalam piknometer dan atur suhu piknometer hingga 25°C. Kemudian bobot jenis dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Bobot jenis} = \frac{\text{bobot ekstrak cair (gr)}}{\text{bobot air (gr)}} \times \text{bobot jenis air} \left(\frac{\text{gr}}{\text{ml}}\right)$$

d. Kadar Air

Ekstrak daun kelakai ditimbang sebanyak 10 gr dalam kedalam *plate moisture balance* yang telah ditara. Setelah itu keringkan pada suhu 105°C hingga alat berbunyi atau hingga berat konstan. Rumus yang digunakan adalah :

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

Keterangan :

A : bobot sampel sebelum dipanaskan

B : bobot sampel setelah dipanaskan

e. Kadar Abu Total

Ekstrak daun kelakai ditimbang sebanyak 1 gr dan diletakkan dalam krus silikat yang telah ditara sebelumnya. Kemudian ekstrak dilakukan pemijaran pada suhu 600°C perlahan-lahan sampai berbentuk abu. Krus silikat kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang hingga bobot tetap. Dihitung kadar abu total yang dinyatakan dalam % dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{bobot abu (gr)}}{\text{bobot ekstrak (gr)}} \times 100\%$$

5. Uji Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Ekstrak daun kelakai sebanyak 1 gr diencerkan dengan 4 mL kloroform dan 4 mL ammonia lalu disaring. Ekstrak tadi ditambahkan 3 – 5 tetes H₂SO₄ pekat, kemudian diguncangkan hingga terbentuk 2 *layer*. *Layer* paling atas dipindahkan ke 3

tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan pereaksi Mayer, Dragendorff dan Wagner sebanyak 4 – 5 tetes. Positif alkaloid akan ditandai dengan terbentuknya sedimen putih pada pereaksi Mayer, sedimen merah jingga pada pereaksi Dragendorff dan sedimen coklat pada pereaksi Wagner (Harborne, 1987).

b. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 gr ekstrak daun kelakai ditambahkan dengan 10 mL air panas, kemudian dididihkan selama 5 menit. Saring filtrat, kemudian ditambahkan 0,1 gr serbuk magnesium dan 1 mL *Hydrochloride* pekat, diguncangkan kuat-kuat. Positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga (Harborne, 1987).

c. Uji Saponin

Ekstrak daun kelakai diencerkan dengan 10 mL air panas sambil dilakukan pengocokan selama 1 menit, lalu diteteskan 2 tetes *Hydrochloride* 2 N. Positif saponin ditandai apabila busa terbentuk setimbang selama < 10 menit (Harborne, 1987).

d. Uji Tanin

Ekstrak daun kelakai diteteskan dengan 3-5 tetes FeCl_3 10%. Positif tanin ditandai dengan terbentuknya sedimen warna hijau kehitaman atau biru kehitaman (Harborne, 1987).

6. Pengujian Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kelakai

a. Pembuatan Larutan DPPH

DPPH ditimbang sebanyak 2.5 mg, kemudian diencerkan dengan 10 mL etanol p. a 96%. Masukkan kedalam labu ukur kaca 50 mL lalu ditambahkan etanol 96% *ad* tanda batas, maka akan didapatkan larutan DPPH dengan konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$ (*microgram/ml*).

b. Optimasi Panjang Gelombang DPPH

Dibuat larutan DPPH konsentrasi 4 $\mu\text{g/ml}$ (*microgram/ml*) dengan memipet 0.8 mL ke dalam labu ukur 10 mL, cukupkan *ad* (hingga) batas dengan etanol 96%. Sebanyak 2 mL larutan DPPH

dituangkan kedalam tabung reaksi, tambahkan etanol 96% sebanyak 2 mL. Tabung reaksi kemudian diaduk sampai merata (homogen) atau \pm selama 30 menit. Setelah itu larutan disimpan pada suhu kamar dengan ruangan tanpa cahaya selama 30 menit. Tentukan panjang serapannya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada *wavelength* 400 – 800 nanometer.

c. Pembuatan Larutan Vitamin C sebagai Pembanding

Vitamin C ditimbang sebesar 25 mg, setelah itu diencerkan dalam etanol p. a 96%, kemudian dituangkan kedalam labu ukur 25 mL, dan dicukupkan dengan zat pendispersi (pelarut) *ad* (hingga) tanda batas, maka didapatkan larutan vitamin C dengan konsentrasi 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Kemudian dibuat seri konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 1000 $\mu\text{g/ml}$ (*microgram/ml*). Masing-masing seri dituangkan kedalam labu ukur, dan ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas.

Masing-masing sediaan uji dipipet sebanyak 6 mL kemudian dituangkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan dengan larutan DPPH sebanyak masing-masing 6 mL. Tabung reaksi kemudian diaduk sampai merata (homogen). Setelah itu diletakkan pada ruangan gelap dan tertutup pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang *wavelength* 515 – 520 nanometer.

d. Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol Daun Kelakai

Ekstrak etanol daun kelakai ditimbang sebanyak 50 mg dan diencerkan dalam etanol p. a 96%, setelah itu dituangkan kedalam labu ukur 50 mL, dan dicukupkan dengan zat pendispersi (pelarut) *ad* (hingga) tanda batas, maka didapatkan larutan ekstrak daun kelakai dengan konsentrasi 1.000 $\mu\text{g/ml}$ (*microgram/ml*). Kemudian dibuat seri konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 $\mu\text{g/ml}$ (*microgram/ml*). Masing-masing seri dituangkan kedalam labu ukur, dan diencerkan dengan etanol p. a 96% *ad* tanda batas.

Masing-masing larutan uji dipipet sebanyak 6 mL kemudian dituangkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan dengan larutan DPPH sebanyak masing-masing 6 mL. Tabung reaksi kemudian divortex hingga homogen. Setelah itu diletakkan pada ruangan gelap dan tertutup selama 30 menit. Selanjutnya larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada *wavelength* 515 – 520 nanometer.

I. JADWAL PENELITIAN

No.	Jenis Kegiatan	Bulan					
		Okt	Nov	Des	Jan	Feb	Mar
1	Penentuan dan penetapan judul						
2	Penyusunan proposal penelitian						
3	Pengajuan proposal						
4	Desk evaluasi						
5	Revisi hasil desk evaluasi penelitian						
6	Perizinan						
7	Pengambilan sampel						
8	Pengujian sampel di laboratorium						
9	Penyusunan proposal hasil						
10	Seminar hasil						

Tabel 3. 1 Jadwal Penelitian