

BAB III METODE PENELITIAN

A. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini memakai metode eksperimental menggunakan ekstrak daun sungkai dan kulit batang sungkai (*Peronema canescens* Jack). Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini yaitu pembuatan simplisia, pembuatan ekstrak, identifikasi senyawa, dan pengujian menggunakan metode DPPH dengan instrument spektrofotometri UV-Visibel untuk melihat nilai IC₅₀ atau persen inhibisi dari sampel ekstrak yang akan diuji.

B. SUBJEK DAN OBJEK PENELITIAN

1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah Daun Dan Kulit Batang Sungkai yang diambil dari daerah Tenggarong, Kalimantan Timur.

2. Objek Penelitian

Objek penelitian adalah aktivitas antioksidan Ekstrak Daun Dan Kulit Batang Sungkai (*Peronema canescens* Jack).

C. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2021 hingga Mei 2022 di Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

D. DEFINISI OPRASIONAL

1. Definisi Oprasional

- a. Ekstrak Daun dan Kulit Kayu Sungkai (*Peronema canescens* Jack) merupakan hasil dari maserasi simplisia menggunakan pelarut etanol 96%.
- b. Ekstraksi ialah proses pemisahan suatu zat dari campurannya menggunakan bantuan pelarut.

- c. Antioksidan yaitu senyawa yang menetralkan terjadinya peningkatan radikal bebas, melindungi sel dari efek racun dan membantu pencegahan beberapa penyakit.
- d. Metode DPPH sering digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan. Prinsipnya adalah mengukur kadar berdasarkan total electron ganjil dalam molekul DPPH yang memberikan serapan maksimal di panjang gelombang 517 nanometer berwarna ungu.

2. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas
Ekstrak Daun Dan Kulit Batang Sungkai (*Peronema canescens* Jack).
- b. Variable terikat
Nilai IC₅₀ aktivitas antioksidan.

E. INSTRUMEN PENELITIAN

1. Bahan Penelitian

Daun dan kulit batang sungkai, etanol 96%, DPPH, vitamin c, aquadest, pereaksi dragendroff, HCl 2N, HCl pekat, Serbuk magnesium, Pereaksi *Lieberman Burchard*, kloroform.

2. Alat Penelitian

Cawan porselen, gelas ukur, gelas beaker, penangas air, pipet mikro 100-1000 μ L, spektrofotometer UV-Vis, kuvet kuarsa, rotary vakum evaporator, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kertas saring, dan labu ukur.

F. METODE PENGUMPULAN DATA

Metode pengumpulan data dalam penelitian ini ialah sebagai berikut:

1. Studi kepustakaan

Studi literature yang peneliti dapatkan digunakan sebagai dasar panduan dan pedoman untuk melakukan penelitian yang didapatkan dari berbagai sumber seperti jurnal, artikel, buku, skripsi, dan karya ilmiah sebagai bahan perbandingan dalam penelitian.

2. Metode eksperimen

Metode ini digunakan bertujuan untuk mengetahui proses dan tahapan dalam Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun dan kulit batang sungkai (*Peronema canescens* Jack) yang dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Laboratorium Kimia, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

G. TEKNIK ANALISIS DATA

Analisis data dalam penelitian ini menggunakan regresi linier untuk mengetahui nilai IC_{50} dan membandingkan aktivitas antioksidan daun dan kulit batang sungkai pada nilai IC_{50} sebagai parameter dari aktivitas antioksidan. Ekstrak dinyatakan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50.

H. ALUR JALANYA PENELITIAN

1. Determinasi Tumbuhan

Sampel tumbuhan yang diperoleh di daerah Tenggarong, Provinsi Kalimantan Timur di determinasi di Laboratorium Ekologi dan Konservasi Biodiversitas Hutan Tropis Universitas Mulawarman, Kalimantan Timur untuk diidentifikasi kebenaran tumbuhan Sungkai (*Peronema canescens* Jack).

2. Penyiapan Sampel

a. Pengambilan Sampel

Menggunakan sampel daun dan kulit batang sungkai yang diperoleh di daerah Tenggarong, Provinsi Kalimantan Timur.

b. Pembuatan Ekstrak

Daun dan kulit batang sungkai yang telah dikumpulkan lalu bersihkan dari benda asing dan kotoran lain, kemudian di cuci menggunakan air mengalir hingga bersih. Setelah dicuci bersih dikeringkan dengan cara dijemur menggunakan cahaya matahari. Simplisia kering kemudian dihaluskan.

Simplisia diekstraksi secara maserasi menggunakan etanol 96% di suhu kamar 3 x 24 jam. Kemudian masukkan ke dalam

wadah tertutup rapat terlindung cahaya matahari sambil diaduk. Hasil maserasi disaring, lalu diremaserasi dan di rotavapor. Hasil ekstrak encer diuapkan hingga menjadi ekstrak pekat (Aminah *et al.*, 2016).

3. Skrining Fitokimia

a. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dengan mengambil sampel yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ekstrak dilarutkan dalam 2-3 mL etanol, dipanaskan di atas penangas, kemudian 0,1 g serbuk mg ditambahkan, kemudian ditambahkan 2 mL HCl pekat. Reaksi positif dengan pembentukan warna merah, kuning atau oranye (Hanani, E. 2016).

b. Uji Steroid dan Terpenoid

Uji triterpenoid dengan memasukkan sampel ekstrak ke tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes CHCl_3 dan ditetesi pereaksi Liebermann burchard. Amati perubahan warna yang terjadi. Hasil penelitian menunjukkan positif mengandung steroid yang ditunjukkan dengan warna hijau. Hasil positif menunjukkan triterpenoid jika ditandai dengan warna merah ungu (Hanani, E. 2016).

c. Uji Saponin

Dimasukan sampel ke dalam tabung reaksi. 10 mL air panas ditambahkan, dinginkan lalu dikocok kuat 10 detik. Terbentuknya busa dengan ketinggian 1-10 cm minimal 10 menit tertanda positif saponin, kemudian ditambahkan dengan 1 tetes HCl 2N, buih tidak hilang (Hanani, E. 2016).

d. Uji Tanin

Uji tannin dengan memasukkan sampel ke tabung reaksi. Ekstrak dilarutkan 5 mL air panas dan ditambah 2-3 tetes larutan FeCl_3 bila berwarna biru pekat atau hitam kehijauan terdapatnya tanin (Hanani, E. 2016).

e. Uji Alkaloid

Uji kandungan alkaloid dengan memasukkan sampel ke dalam tabung reaksi tambahkan 1 mL HCl 2 N dan 9 mL aquades, panaskan di atas penangas selama 2 menit, dinginkan dan disaring. Dua tetes pereaksi Meyer di tambahkan ke filtrat. Positif dengan terdapat sedimen atau kekeruhan sampel mengandung alkaloid (Kumalasari & Musiam, 2019).

4. Uji Aktivitas Antioksidan**a. Pembuatan larutan DPPH**

Sebanyak 6 mg serbuk ditimbang kemudian larutkan dalam etanol. Kemudian dimasukkan ke labu ukur 100 mL.

b. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan DPPH sebanyak 1 mL dan ditambah 2 mL etanol.

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan DPPH dipipet, kemudian diukur serapanya menggunakan spektrofotometri UV-Visibel di panjang gelombang 400-800 nanometer.

d. Pembuatan Larutan Induk dan Seri Konsetrasi Ekstrak

Sebanyak 25 mg ekstrak daun dan kulit batang sungkai ditimbang, kemudian diarutkan di labu ukur 25 mL lalu tambahkan etanol sampai tanda batas, dikocok hingga larut dicukupkan menggunakan etanol sampai tanda garis (1000 µg/mL).

Pembuatan seri konsentrasi sebesar 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, dan 100 µg/m, diambil larutan induk, kemudian setiap konsentrasi ditempatkan di labu ukur dan masukan etanol sampai tanda batas.

e. Pembuatan Larutan Induk dan Seri Konsetrasi Vitamin C

Sebanyak 25 mg vitamin c ditimbang, kemudian larutkan dalam labu ukur 25 mL ditambahkan etanol hingga tanda batas, dikocok sampai larut dicukupkan dengan etanol sampai tanda garis(1000 µg/mL).

Pembuatan seri konsentrasi sebesar 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, dan 100 µg/mL dengan cara mengambil larutan induk, kemudian setiap konsentrasi dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambah etanol sampai tanda batas.

f. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian menggunakan metode DPPH. Pada masing konsentrasi diambil sebanyak 2 mL dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL larutan DPPH, didiamkan di ruang gelap selama 30 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometri UV-Visibel di panjang maksimum sesuai hasil yang diperoleh.

g. Analisis Data

Persentase inhibisi menggunakan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \left(\frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan ditentukan oleh nilai IC₅₀. IC₅₀ merupakan angka yang melihatkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas radikal sebesar 50%.

Nilai IC₅₀ untuk setiap konsentrasi sampel dihitung dengan persamaan regresi linier $y = ax + b$, yang menyatakan nilai IC₅₀ pada sumbu x dan % penghambatan dinyatakan pada sumbu y (Ditha, 2019).

