

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan fraksinasi n-Heksan dan etil asetat daun sukun (*Artocarpus altilis (Parkinson) Forsberg.*) dalam mengukur aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase. Tahapan yang akan dilakukan pada penelitian ini meliputi, pembuatan simplisia, pembuatan ekstrak, pembuatan fraksinasi, identifikasi senyawa metabolit sekunder dan pengujian spektrofotometri UV-Vis untuk melihat IC₅₀ dari fraksinasi n-Heksan dan etil asetat daun sukun (*Artocarpus altilis (Parkinson) Forsberg.*). Dilakukannya perhitungan persen aktivitas penghambat enzim xantin oksidase dari hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dilanjutkan dengan analisis regresi linier untuk memperoleh nilai IC₅₀.

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek

Subjek pada penelitian ini adalah Fraksinasi n-Heksan dan etil asetat daun sukun (*Artocarpus altilis (Parkinson) Forsberg.*).

2. Objek pada penelitian ini adalah aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Februari – April 2022 yang dilaksanakan di Laboratorium Kimia Bahan Alam untuk melakukan proses ekstraksi dan fraksinasi. Sedangkan, untuk skrining fitokimia serta uji aktivitas penghambat enzim xantin oksidase dilakukan di Laboratorium Kimia, Fakultas farmasi, Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

D. Definisi Operasional

1. Definisi Operasional

- a. Metabolit sekunder adalah suatu senyawa yang dihasilkan pada jalur metabolisme lain yang meskipun diperlukan tetapi dianggap tidak memiliki peran penting dalam pertumbuhan tanaman tetapi merupakan sumber senyawa obat untuk manusia 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 enzim xantin oksidase sebanyak 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin tinggi aktivitas penghambatan xantin oksidase yang terjadi.
- c. Ekstraksi adalah proses pemisahan berdasarkan perbedaan kelarutan komponen-komponen dalam campuran pada perpindahan suatu zat atau zat terlarut dari larutan asli atau padat menjadi pelarut tertentu.
- d. Fraksinasi merupakan suatu proses penarikan komponen senyawa pada ekstrak dengan menggunakan dua jenis pelarut yang berlawanan atau tidak saling tercampur.
- e. Xantin oksidase merupakan enzim yang berperan dalam mengkatalisis oksidasi hipoxantin menjadi xantin dan menjadi asam urat.
- f. Hiperurisemia merupakan ketidakseimbangan antara produksi pembentukan purin dan kemampuan ginjal dalam mengekskresi kadar asam urat dalam darah.

2. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas
Perbandingan fraksinasi n-Heksan dan etil asetat daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Forsberg.) menggunakan spektrofotometri UV-Vis

b. Variabel terikat

Nilai IC₅₀ Aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase.

E. Instrumen Penelitian

1. Bahan penelitian

Daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Forsberg.), allopurinol, metanol, pelarut n-Heksan dan etil asetat, substrat xantin (*Stigma x0626-5G Xanthine*), enzim xantin oksidase (*Stigma x1875 UN Xanthine Oxidase*), aquadest, aquadest bebas CO₂, pereaksi dregendroff, preaksi wagner, preaksi mayer, Pereaksi Lieberman Burchard, FeCl₃ 1%, HCl pekat, HCl 2N, NaCl, Serbuk magnesium, CHCl₃, NH₃, NaOH, H₂SO₄, dan larutan dapar fosfat 0,05 M pH 7,5.

2. Alat penelitian

Termometer (*Yunaco*), pipet mikro 100-1000µL (*Scilogex*), pipet tetes (*One lab*), spektrofotometer UV-Vis (*Thermo scientific Genesys 10s UV-Vis*), kuvet kuarsa, cawan porselen, gelas ukur (*Iwaki*), corong kaca, gelas beaker (*Iwaki*), rotary evaporator (*Buchin rotavapor R-100*), waterbath (*Faithful*), rak dan tabung reaksi (*Iwaki*), kertas saring, corong pisah (*Pyrex*), batang pengaduk, spatel, statik dan corong pisah, hot plate (*Maspion*), kaca arloji, erlenmeyer (*Pyrex*), labu ukur (*Iwaki*), neraca analitik (*FSR B1200 Fujitsu*).

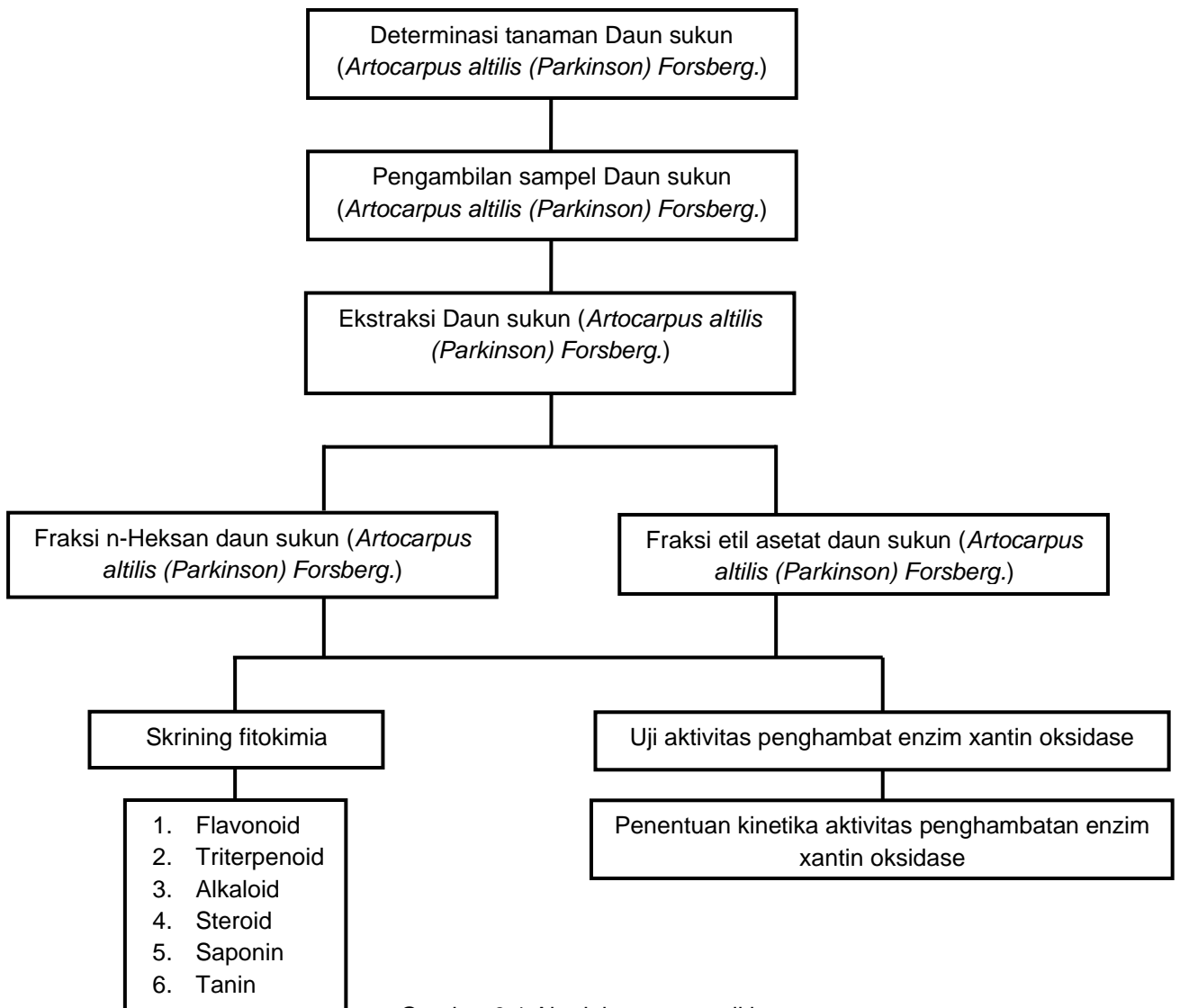
F. Metode Pengumpulan Data

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratoris 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 sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Forsberg.) menggunakan spektrofotometri UV-vis dan menganalisis regresi linier untuk mendapatkan nilai IC₅₀.

G. Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh untuk menentukan nilai IC_{50} adalah persen inhibisi dan konsentrasi sampel. Dengan dilakukannya 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 untuk menentukan nilai IC_{50} (*Inhibitor concentration 50%*) dari masing-masing sampel, setelah itu ditetapkan bahwa persamaan variabel (y) dengan ketetapan nilai 50 dan (x) merupakan nilai IC_{50} yang akan diperoleh.

H. Alur Jalannya Penelitian



Gambar 3.1 Alur jalannya penelitian

1. Determinasi Tumbuhan

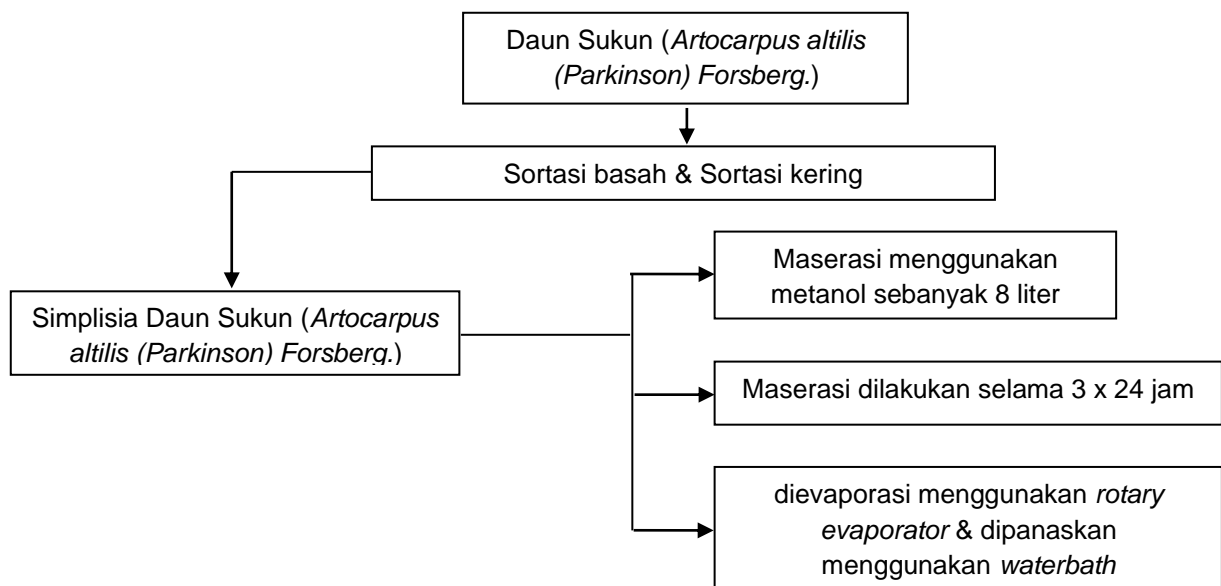
Determinasi pada tumbuhan sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Forsberg.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Konservasi abaiodiversitas Hutan Tropis Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman Samarinda. Bagian yang digunakan dalam determinasi yaitu bagian daun dari tumbuhan sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Forsberg.).

2. Pengambilan Sampel

Daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Forsberg.) diperoleh dari daerah Samarinda tepatnya di Jl. Kelapa Gading Gg. Kelapa Gading 25, Kel. Karang Anyar, Kec. Sungai Kunjang, Kota Samarinda, Kalimantan Timur, pada tanggal 06 Januari 2022.

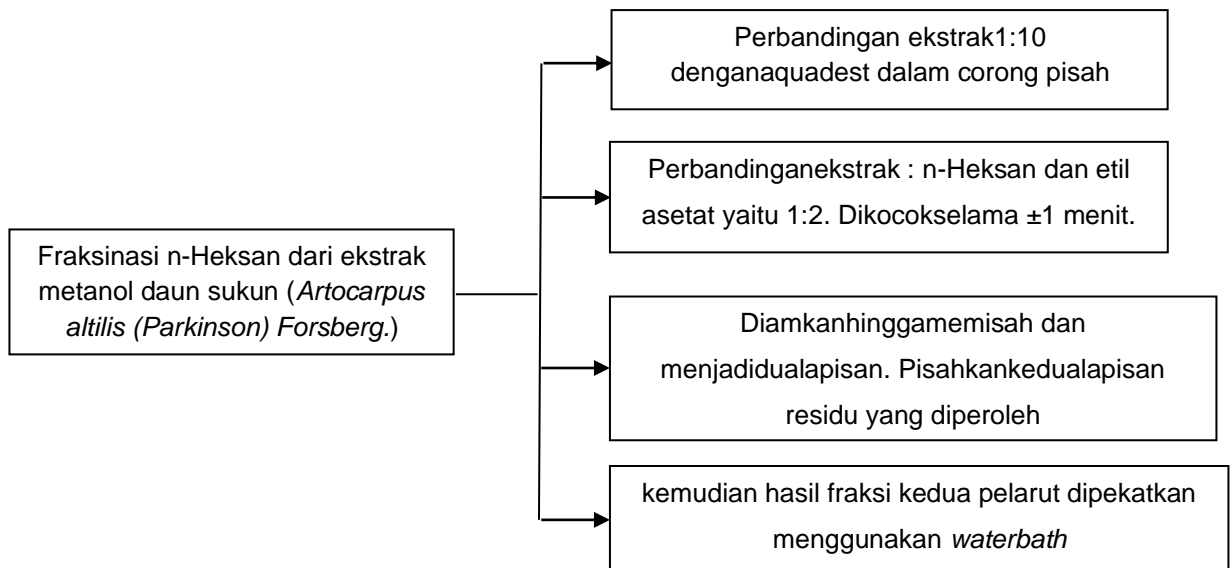
3. Pembuatan Sampel

a. Pembuatan ekstrak metanol daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Forsberg.)



Gambar 3.2 Pembuatan ekstrak metanol daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Forsberg.)

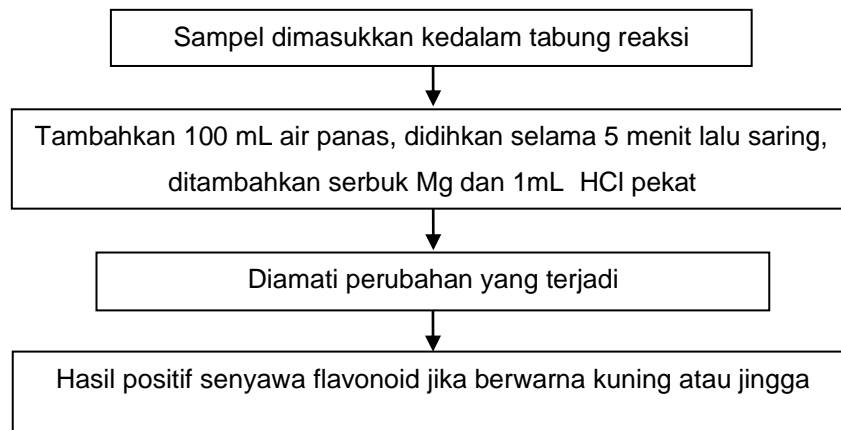
b. Pembuatan fraksin-Heksandan etil asetat daun sukun
(*Artocarpus altilis* (Parkinson) Forsberg.)



Gambar 3.3 Pembuatan fraksi n-Heksan dan etil asetat daun sukun

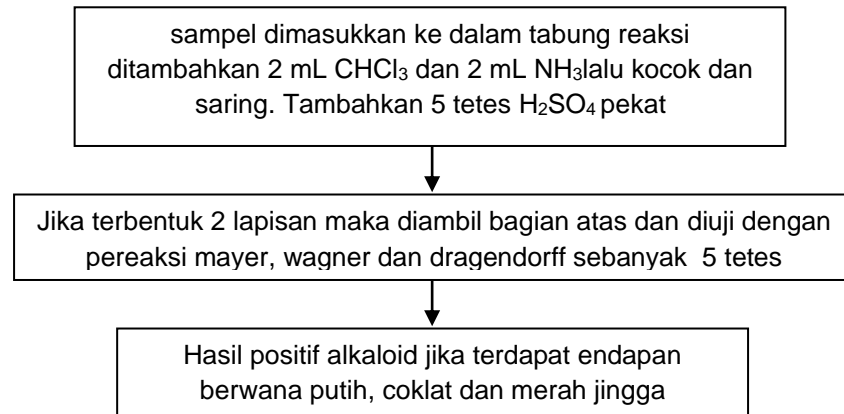
4. Skrining Fitokimia

a. Flavonoid



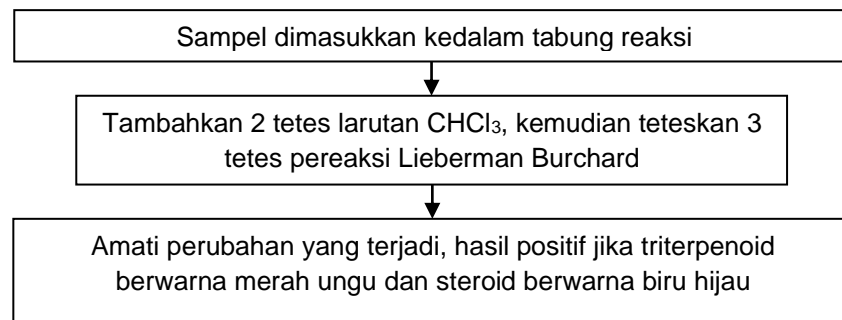
Gambar 3.4 Flavonoid

b. Alkaloid



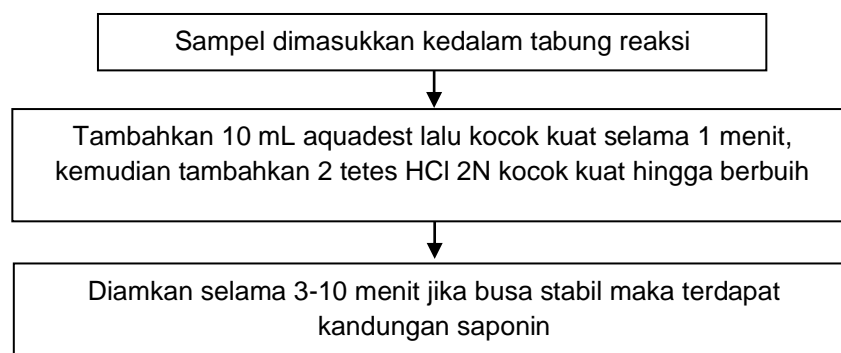
Gambar 3.5 Alkaloid

c. Terpenoid& Steroid



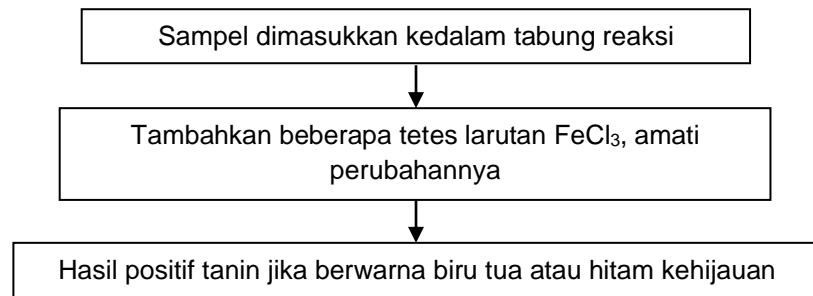
Gambar 3.6 Terpenoid& Steroid

d. Saponin



Gambar 3.7 Saponin

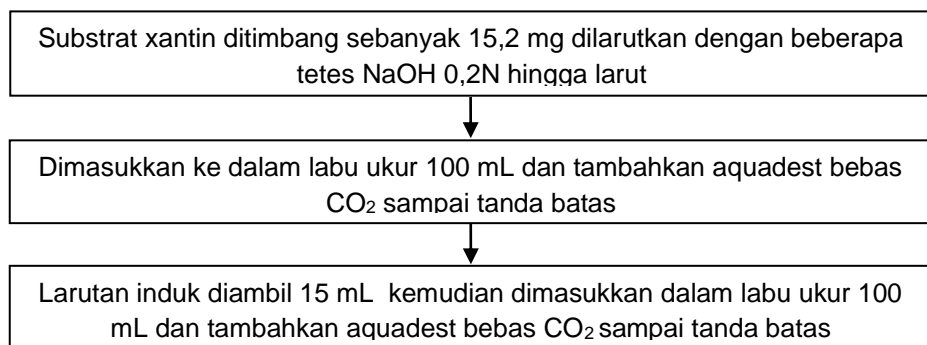
e. Tanin



Gambar 3.8 Tanin

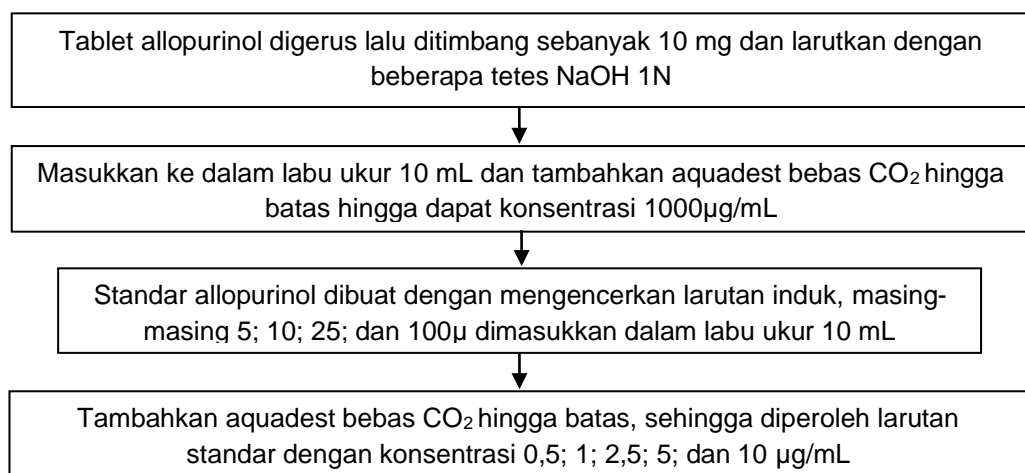
5. Pembuatan larutan

a. Pembuatan Larutan Substrat Xantin



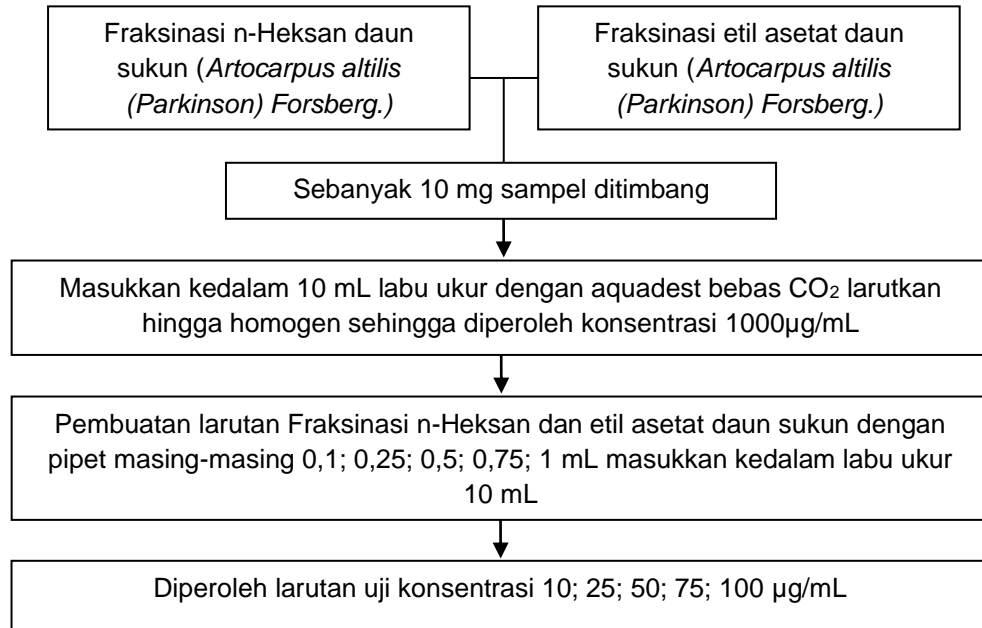
Gambar 3.9 Pembuatan Larutan Substrat Xantin

b. Pembuatan Larutan Standar Allopurinol 1000µg/mL



Gambar 3.10 Larutan Standar Allopurinol 1000µg/mL

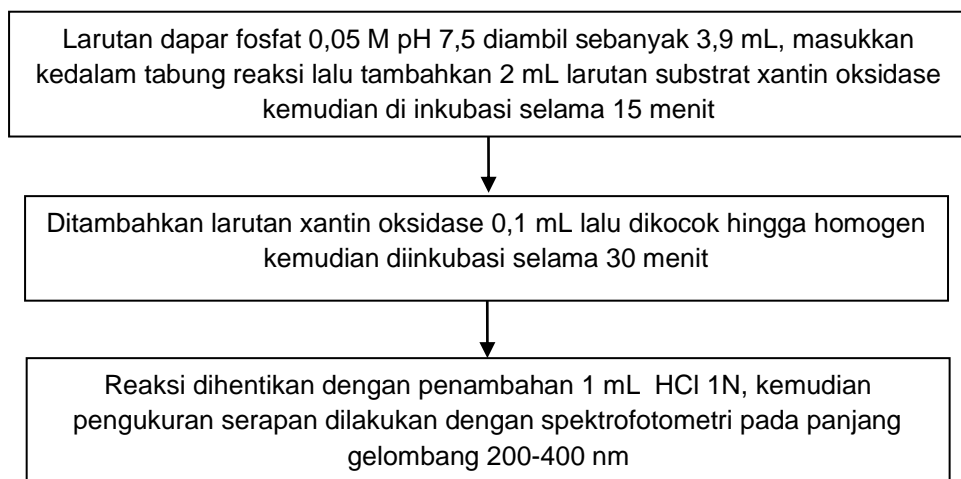
c. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Sampel Fraksinasi n-Heksan dan etil asetat Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Forsberg.)



Gambar 3.11 Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Sampel Fraksinasi n-Heksan dan etil asetat Daun Sukun

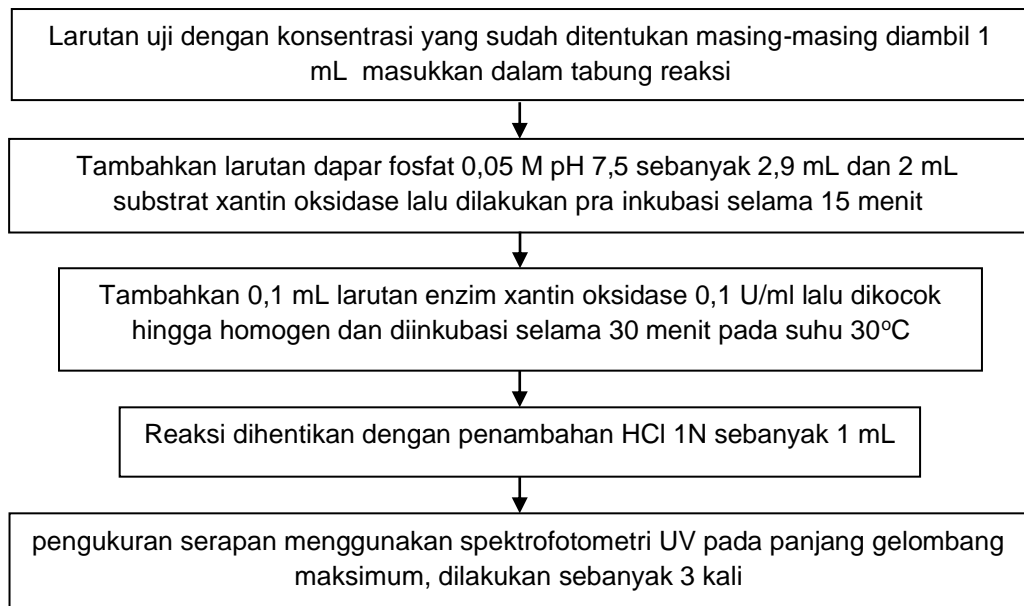
6. Uji aktivitas penghambat enzim xantin oksidase

a. Penentuan Optimasi Panjang Gelombang Maksimum



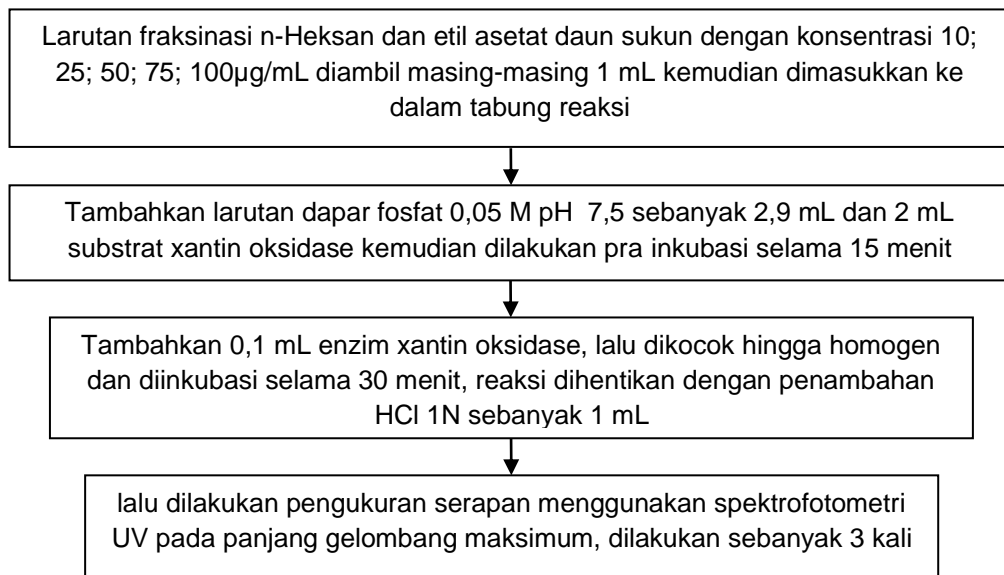
Gambar 3.12 Penentuan Optimasi Panjang Gelombang Maksimum

b. Pengujian Efek Inhibisi Larutan Standar Allopurinol



Gambar 3.13 Pengujian Efek Inhibisi Larutan Standar Allopurinol

c. Pengujian Efek Inhibisi Larutan Sampel



Gambar 3.14 Pengujian Efek Inhibisi Larutan Sampel

