

BAB III METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Metode penelitian ini dilaksanakan secara eksperimental dengan mengukur kadar toksisitas dari simplisia dan melakukan pengukuran aktivitas antioksidan dari simplisia menggunakan metode FRAP.

Saat pengujian antioksidan dilakukan terlebih dahulu maserasi untuk mendapatkan ekstrak dari daun Sungkai (*P. canescens* Jack). Kemudian dilakukan uji fitokimia yang bertujuan sebagai cara mencari tau kandungan senyawa pada ekstrak daun sungkai (*P. canescens* Jack), setelah itu dilakukan uji antioksidan pada daun sungkai (*P. canescens* Jack) menggunakan metode FRAP dengan alat spektrofotometer dengan yang berdasarkan pada reduksi analog ferroin antioksidan mereduksi Fe(III)-TPTZ menjadi Fe(II)-TPTZ dan terjadi perubahan warna dari kuning menjadi biru. TPTZ sendiri merupakan zat warna, sedangkan Fe(III) adalah radikal bebas. Nilai aktivitas antioksidan ditentukan dengan mencampurkan reagen FRAP dengan ekstrak daun nanasektrak daun sungkai (*P. canescens* Jack). Reagen FRAP termasuk campuran TPTZ, FeCl₃, dan buffer asetat. Pada penelitian ini digunakan ferrous sulfat sebagai pembanding karena ferrous sulfat merupakan antioksidan sintetik. Ferro sulfat adalah senyawa kimia yang mempunyai rumus FeSO₄.7H₂O.

Pada penelitian ini populasi yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 2 bulan dan mempunyai berat badan 267-500 gram. Ke-15 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan dibagi menjadi tiga kelompok. pemberian ekstrak dengan tiga dosis berbeda yaitu X (kelompok 1), X (kelompok 2), dan X (kelompok 3). Kelompok I, II dan III diberi sediaan uji per oral selama 7 hari.

Uji Toksisitas Akut Daun Sungkai (*P. canescens* Jack). Hal ini dilakukan pada hewan laboratorium dengan mengamati apakah ada reaksi eksternal yang terlihat pada tikus. Metode yang digunakan dalam penelitian toksisitas ini adalah metode Weil. Nilai LD⁵⁰ dihitung

menggunakan tabel biometrik oleh Weil. Nilai LD⁵⁰ diketahui dari 50% kematian hewan uji.

B. Subjek dan Objek Penelitian

Daun sungkai (*P. canescens* Jack) didapatkan di daerah Samarinda. Tikus (*Rattus norvegicus*) diadaptasi selama 7 hari dan kemudian dijadikan objek pada penelitian ini.

1. Kriteria Inklusi

- a. Berat badan tikus 267-500 gram
- b. Tikus jantan
- c. Kondisi fisik sehat berusia 2 bulan

2. Kriteria Eksklusi

- a. Sakit selama masa adaptasi
- b. Mati dalam penelitian

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember - Mei 2021 yang dilaksanakan di Laboratorium Kimia Bahan Alam, Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Kimia di Universitas Kalimantan Timur.

D. Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a. Variabel Bebas yaitu dosis kombinasi ekstrak daun sungkai (*Peronema canescens* Jack).
- b. Variabel Terikat kadar toksisitas akut (LD⁵⁰) dan kadar antioksidan pada tikus.
- c. Variabel Terkendali yaitu jenis hewan coba usia, pemeliharaan, waktu pemberian dan berat badan hewan uji.

2. Definisi Operasional

- a. Atom atau gugus dengan satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan disebut radikal bebas. Selain itu, ada radikal bebas di lingkungan, beberapa logam (termasuk besi dan tembaga), asap tembakau, obat-obatan, makanan olahan, aditif, dan lain-lain. Menggunakan antioksidan yang dibuat oleh

tubuh akan membantu mencegah pembentukan radikal bebas ini.

- b. Spektrofotometer dapat digunakan untuk mengukur uji antioksidan, yang mengukur kapasitas suatu zat untuk menghalangi reaksi oksidatif.
- c. Uji toksisitas mengukur tingkat toksisitas sampel pada setiap konsentrasi. Dengan menghitung jumlah hewan uji yang mati hingga 50% dari total populasi hewan uji, dilakukan tindakan toksisitas.
- d. Diberikan dalam waktu 24 jam setelah obat, dosis atau konsentrasi LC^{50} dapat menyebabkan 50% populasi hewan uji mati. Persamaan garis lurus yang mewakili hubungan antara nilai probit dan log dosis digunakan untuk menghitung LC^{50} .
- e. FRAP merupakan pengujian yang menggunakan spektrofotometer UV-Visible untuk mengukur daya antioksidan pada reduksi Fe (III) -TPTZ menjadi Fe (II) -TPTZ dan perubahan warna dari kuning menjadi biru.

E. Instrumen Penelitian

1. Bahan Penelitian

Sampel daun sungkai (*P. canescens* Jack), etanol 96%, Aquadest, aqua demineralisata, Tikus (*Rattus norvegicus*), larutan dapar, HCl pekat, $FeSO_4$ (fero sulfat), 2,4,6-tripirydilstriazine (TPTZ), $FeSO_3$, serbuk Mg, reagen *dragendroff*, reagen *mayer*, HCl 2 N, $FeCl_3$ 1%, $FeCl_3$ 5%.

2. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas (*Pyrex*), sonde oral, spuit, seperangkat alat maserasi, neraca analitik, cawan porselen, kertas saring, *rotary evaporator*, toples penyimpanan, Spektrofotometer UV-Vis, mikropipet, tip, timbangan miligram, *waterbath*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, termometer, spatel, mikro *tube*, dan vortex.

F. Metode Uji Fitokimia

Untuk mengetahui kandungan senyawa alkaloid, fenol, tanin, flavonoid, dan saponin, maka digunakan uji fitokimia. Pemeriksaan senyawa ini dilakukan dengan menggunakan reagen-reagen tertentu untuk menunjukkan adanya kandungan senyawa pada ekstrak daun sungkai (*P. canescens* Jack) yang ditunjukkan dengan perubahan warna dan terbentuknya endapan. Pertama melarutkan terlebih dahulu 0,5 g ekstrak daun sungkai (*P. canescens* Jack) dengan pelarut yang sesuai.

Prinsip uji tabung merupakan uji yang memiliki kegunaan untuk mencari tau kandungan senyawa fitokimia yang terdapat dalam sampel. Penggunaan uji tabung dikarenakan alat yang digunakan mudah dicari. Uji tabung digunakan untuk menampung, mencampur dan memanaskan dalam sejumlah kecil bahan kimia padat maupun cair, terutama untuk uji kualitatif.

1. Pemeriksaan Alkaloid

Reagen yang digunakan untuk uji alkaloid adalah reagen HCl 2 N dan pereaksi yang digunakan adalah dragenroff dan mayer. Caranya adalah dengan diisinya tabung reaksi dengan memasukkan 2 ml ekstrak daun sungkai yang sudah kemudian ditambah dengan 2 ml HCl 2 N. Setelah itu dibagi dua larutan masing-masing sebanyak 2 ml lalu pada tabung 1 ditetaskan reagen dragenroff 3 tetes, pada tabung 2 ditetaskan reagen mayer 3 tetes. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan jingga pada tabung 1 dan endapan putih pada tabung 2.

Pada skrining alkaloid menunjukkan hasil positif yang ditambahkan dengan reagen Mayer dan Dragendroff. Karena alkaloid bersifat asam dan diekstraksi menggunakan pelarut asam, maka ditambahkan HCl. Pereaksi Meyer dianggap positif jika terbentuk endapan putih. Endapan yang terbentuk adalah alkaloid kalium. Endapannya adalah kompleks kalium alkaloid. Alkaloid dapat digunakan untuk membuat koneksi kovalen koordinat dengan

ion logam karena mereka memiliki atom nitrogen dengan sepasang elektron tunggal. Kompleks alkaloid kalium yang diendapkan terbentuk ketika nitrogen dalam alkaloid bergabung dengan ion logam kalium tetraiodomercuri(II) dan K^+ . Reagen Dragendorff digunakan untuk mendeteksi senyawa dalam suatu sampel uji. Jika sampel positif pereaksi Dragendorff, akan terbentuk endapan kuning kecoklatan. Endapan yang terbentuk adalah alkaloid kalium. Uji Dragendorff menggunakan nitrogen untuk membentuk ikatan kovalen koordinatif dengan ion K^+ , yang merupakan ion logam. Karena garam bismut mudah dihidrolisis untuk menghasilkan ion bismut (BiO^+), bismut nitrat larut dalam HCl untuk hidrolisis dalam proses pereaksi Dragendorff (Antonius Padua Ratu, 2012).

2. Pemeriksaan Flavonoid

Serbuk magnesium (Mg) dan reagen HCl pekat digunakan untuk melakukan uji flavonoid. Menambahkan 2 ml sampel, 2 tetes HCl pekat, 0,05 g bubuk magnesium (Mg), dan memanaskannya di atas penangas air adalah langkah kuncinya. Perubahan warna menjadi merah, jingga, atau kuning menunjukkan hasil positif mengandung flavonoid.

Skrining flavonoid yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid adalah uji Wilstatter dengan mereaksikan sampel dengan memberikan serbuk Mg dan HCl pekat. Warna merah terjadi karena disebabkan terbentuknya garam flavilium.

3. Pemeriksaan Tanin

Pada pemeriksaan senyawa tanin dilakukan dengan menggunakan $FeCl_3$ 5%. Sebanyak 2 ml sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan dengan 3 tetes $FeCl_3$ 5% hasil positif bila ditandai dengan terbentuknya warna biru tua dan hijau kehitaman. Penambahan $FeCl$ digunakan untuk menunjukkan adanya gugus fenol dimana ada kandungan fenol maka dimungkinkan terdapat adanya tanin. Untuk identifikasi tanin

dilakukan dengan mencampurkan FeCl 5% pada sampel hasil dinyatakan positif terdapat perubahan warna menjadi hijau kehitaman.

Tanin akan bereaksi dengan gelatin sehingga membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air.

4. Pemeriksaan Fenol

Pemeriksaan fenol dilakukan dengan memasukkan 2 ml sampel kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan FeCl₃ 1% sebanyak 10 tetes ditambahkan dengan aquadest 1 ml. Bila hasil positif menunjukkan adanya perubahan warna menjadi hijau, merah ungu, biru atau hitam pekat.

5. Pemeriksaan Saponin

Pada pemeriksaan saponin dipanaskan aquadest sebanyak 5 ml dan dicampurkan kedalam sampel sebanyak 2 ml, didinginkan campuran sampel dengan aquadest lalu dikocok selama 1 menit sampai terbentuk buih. Diamkan selama kurang lebih 10 menit hingga didapatkan buih setinggi 1-10 cm.

Uji saponin dilakukan dengan metode *Forth*, uji ini dilakukan dengan terbentuknya busa yang mantap selama 30 detik hingga 1 menit. Adanya molekul glikosida yang dapat membentuk buih dalam air yang dicerna menjadi glukosa dan senyawa lain ditunjukkan dengan adanya buih pada uji *Forth*.

G. Metode Uji Antioksidan

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode FRAP yaitu metode yang mencampurkan beberapa larutan seperti larutan dapar asetat dengan pH 3.6, larutan FeCl₃, larutan TPTZ yang akan di larutkan menggunakan larutan HCl, campuran ini disebut reagen FRAP, lalu untuk larutan standar pengujian dilakukan dengan menggunakan larutan FeSO₄ atau fero sulfat.

Pada saat melakukan analisis semua bahan larutan dicampurkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit lalu akan terjadi perubahan warna dari yang tidak berwarna menjadi biru. Penentuan

panjang gelombang serapan maksimum dilakukan pengukuran absorbansi dari larutan standar FeSO_4 yang dicampurkan reagen FRAP dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, sedangkan untuk penentuan absorbansi sampel dengan mencampurkan reagen FRAP dengan sampel yang diinkubasi dengan suhu 37°C selama 30 menit lalu dibaca gelombangnya dengan spektrofotometri UV-Vis. Setelah semua gelombang terbaca dibuatlah perhitungan nilai absorbansi.

H. Metode uji Toksisitas

Uji toksisitas digunakan untuk mengukur tingkat toksisitas suatu senyawa. Efek berbahaya yang mengikuti pemberian oral dosis tunggal 24 jam terpisah disebut sebagai toksisitas akut. Untuk melakukan penelitian ini, 30 ekor tikus dipisahkan menjadi 3 kelompok dan diberikan ekstrak daun sungkai dosis oral yang bervariasi melalui probe oral. Tikus-tikus tersebut kemudian dimonitor selama 24 jam setiap hari selama 7 hari, dan kemudian dicatat jumlah kematian pada masing-masing kelompok.

I. Metode Pengumpulan Data

Pada penelitian ini uji antioksidan menggunakan metode analisis kuantitatif data diambil dengan cara pengukuran uji minimal 3 x replikasi. Data uji toksistas adalah dengan cara melihat berapa jumlah tikus yang mengalami kematian.

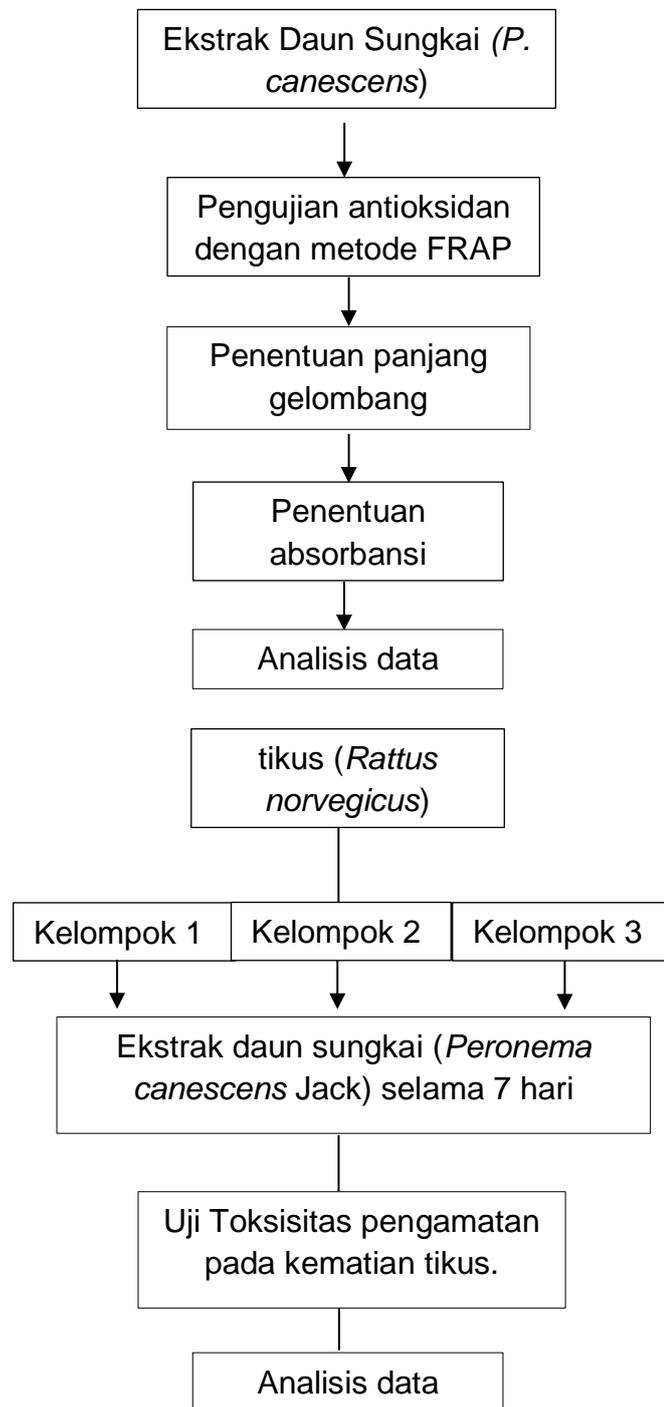
J. Teknik Analisa Data

Data yang diambil adalah analisis dari berapa kadar toksisitas dan jumlah kadar antioksidan antar kelompok kontrol dengan ekstrak daun sungkai (*P. canescens* Jack) dilakukan dengan metode weil dan dengan menggunakan perhitungan regresi linear dan SD (Standar deviasi).

K. Etika Penelitian

Pengujian kode etik dilakukan di Politeknik Kesehatan Negeri Kota Samarinda.

L. Alur Jalannya Penelitian



Gambar 3.1 Jalannya Penelitian

M. Jadwal Penelitian

Tabel 3.1 Jadwal Penelitian

No.	Kegiatan	Desember	Januari	Februari	Maret	April	Mei
1.	Uji Etika Penelitian						
2.	Pengambilan sampel dan determinasi						
3.	Pembuatan simplisia dan ekstrak						
4.	Pengujian efek toksisitas akut dan uji antioksidan						
	a. persiapan & perlakuan hewan uj						
	b. pengamatan morbilitas kehidupan tikus						
	c. pengambilan data						