

BAB III

METODE PENELITIAN

1. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimen.

2. Tempat dan waktu

a. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Sediaan Farmasi Prodi Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang.

b. Waktu penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Februari-Mei

3. Populasi dan sampel

a. Populasi

Dalam penelitian ini, tanaman daun bunga putih (*Clerodendrum costatum* R.Br) diambil dari Desa Otan Kecamatan Semaui Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur, yaitu daun bunga putih yang diambil berwarna hijau tua dan masih segar.

b. Sampel dan teknik sampling

1) Sampel

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman daun bunga putih (*Clerodendrum costatum* R.Br) yang diperoleh dari Desa Otan.

2) Teknik sampling

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah *purposive sampling*, dengan kriteria daun berwarna hijau tua dan masih segar.

4. Variabel Penelitian

a. Variabel terikat

Variabel terikat, yaitu aktivitas antioksidan dari daun tanaman bunga putih. Dengan, melihat nilai IC₅₀ daun bunga putih (*Clerodendrum costatum* R.Br). .

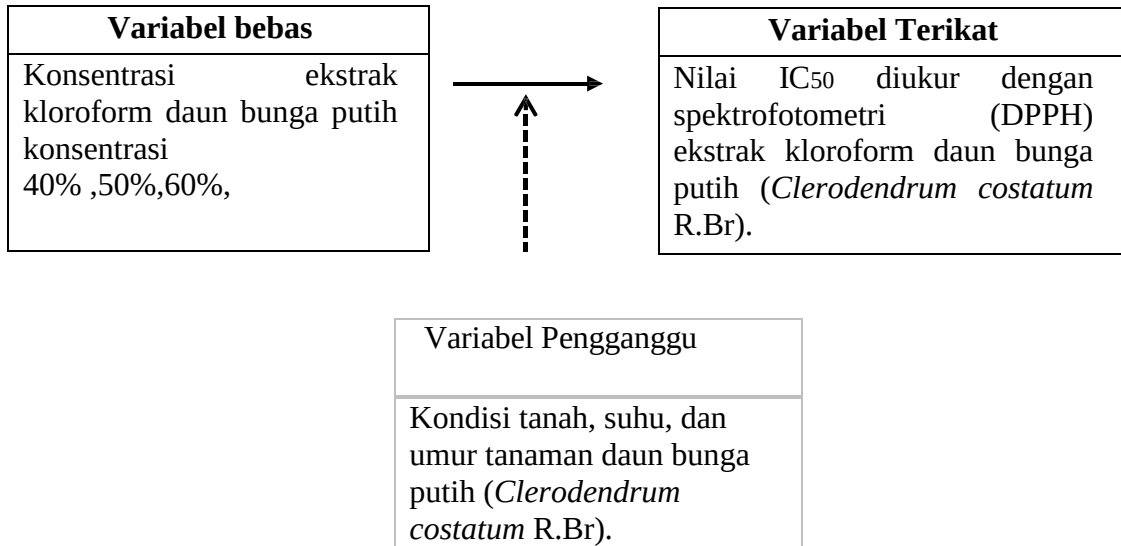
b. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah melihat aktivitas antioksidan daun tanaman bunga putih pada serangkaian konsentrasi 40%, 50%, 60% , dari daun bunga putih (*Clerodendrum costatum* R.Br).

c. Variabel penganggu

Variabel penganggu adalah kondisi tanah, suhu, dan umur tanaman bunga putih (*Clerodendrum costatum* R.Br).

5. Kerangka Konsep



Keterangan ————— : Yang diteliti
 - - - - - : Tidak diteliti

6. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

	Indikator Utama	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala
1	Aktivitas antioksidan	Kemampuan ekstrak kofroform daun bunga putih dalam meredam radikal bebas berdasarkan nilai IC_{50} dengan menggunakan Spektrofotometri UV-VIS	Spektrofotometer UV-Vis	Ratio
2	Daun Bunga Putih (<i>Clerodendrum costatum</i> R.Br.)	Daun bunga putih (<i>Clerodendrum costatum</i> R.Br.) yang diambil dari Pulau Semau, Kab. Kupang NTT yang berwarna hijau tua.		Nominal
3.	Ekstrak kloroform	Ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi daun bunga putih (<i>Clerodendrum costatum</i> R.Br) menggunakan pelarut kloroform.	Beaker glass, <i>Rotary evaporator</i>	Nominal
4.	Metode DPPH	Metode yang digunakan untuk meredam radikal bebas untuk mengetahui aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 515 - 516 nm.	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio
5	Nilai IC_{50}	Parameter konsentrasi yang ekuivalen memberikan 50% aktivitas antioksidan. Semakin kecil harga IC_{50} maka antioksidan itu semakin kuat dalam menangkal radikal bebas atau dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat.	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio

7. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-VIS (PG Instruments Type T92+), Neraca analitik (EW 220-3 NM), vacuum *rotary evaporator*, Bejana maserasi, Beaker gelas (pyrex) berbagai ukuran, Gelas ukur (pyrex) berbagai ukuran, Labu Ukur (pyrex) berbagai ukuran, Batang pengaduk

(pyrex), cawan porselin, Micropipet (dragon med), Pipet tetes, Kertas perkamen, Kertas saring, Tissue (Passeo), Aluminium foil (Pharmaceutical guarantee).

b. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun bungah putih (*Clerodendrum costatum* R.Br) radikal DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) Pelarut kloroform, Kuersetin, , HCL 2N, bubuk Mg, FeCl₃ 1%, Aquades, Asam sulfat, Pereaksi Liebermann bouchard, reagen dragendorf.

8. Prosedur Penelitian

a. Pembuatan Serbuk Simplisia

Dalam proses pembuatan obat herbal, bagian yang diambil adalah daun muda yang segar. Untuk mendapatkan pucuk daun, disarankan menggunakan daun segar berwarna hijau tua. Penyortiran basah dilakukan untuk menghilangkan kotoran atau bahan asing lainnya dari obat herbal. Kemudian, sampel ditimbang. Penimbangan awal, ketika daun masih segar, digunakan untuk menghitung kadar air obat herbal setelah pengeringan. Dalam penelitian ini, berat dasar obat herbal adalah 1 kg. Langkah selanjutnya adalah pencucian. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan kotoran lain yang menempel pada obat herbal. Pencucian dilakukan dengan air bersih yang mengalir. Tahap selanjutnya adalah sortasi kering. Proses sortasi kering ini menghilangkan benda asing, seperti bagian tanaman yang tidak diinginkan atau kotoran yang mungkin menempel pada tanaman selama pengeringan. Setelah kering, tanaman obat dihaluskan menggunakan blender kemudian Penyimpanan serbuk simplisia dilakukan dengan menempatkan serbuk simplisia yang telah halus ke dalam toples dan

menutupnya rapat-rapat untuk melindunginya dari paparan sinar matahari. Setelah serbuk simplisia daun bunga putih siap, langkah selanjutnya adalah sebanyak 200 gram daun bunga putih ditimbang dan ditempatkan dalam sebuah wadah. Daun bunga putih tersebut direndam dengan etanol 96% selama 24 jam. Hasil rendaman kemudian disaring menggunakan kertas saring dan dipekatkan menggunakan destilasi untuk mendapatkan ekstrak etanol daun bunga putih. Ekstrak etanol daun bunga putih kemudian difraksinasi cair-cair dengan pelarut kloroform untuk mendapatkan fraksi kloroform dari ekstrak etanol daun bunga putih. Fraksi kloroform daun bunga putih kemudian dipekatkan menggunakan destilasi dan didapat ekstrak kloroform (Sukarti, 2023).

b. Identifikasi kandungan senyawa fitokimia

1) Identifikasi alkaloid

a) Penyiapan ekstrak

Diuapkandi atas penangas air sampai pekat, ditambahkan 1 mL HCl 2N, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring dipindahkan 3 tetes filtrat pada kaca arloji tambahkan 2 tetes Bouchardat, jika terjadi endapan kuning kemerahan sampai hitam maka ekstrak menunjukkan adanya alkaloid (Yuliani *et al.*, 2015)

b) Reaksi pengendapan

Pembentukan endapan menunjukkan bahwa sampel mengandung alkaloid, dengan reagen Meyer menghasilkan endapan putih, reagen Wagner menghasilkan endapan orans kehitaman (Makalalag, 2010)

2) Identifikasi Flavonoid

a) Penyiapan sampel

0,1 g ekstrak daun bunga putih ditambahkan dengan 3 tetes asam sulfat 2 N. Uji dengan reagen Dragendorff (Yuliana *et al.*, 2023).

b) Reaksi warna

Ke dalam 0,1 g ekstrak daun bunga putih, ditambahkan 0,2 g bubuk Mg, kemudian ditambahkan 5 mL asam klorida pekat. Warna oranye, merah, atau kuning yang dihasilkan menunjukkan adanya flavonoid.

3) Identifikasi Tanin

Sebanyak 0,1 g ekstrak daun bunga putih diuapkan di atas penangas air hingga pekat, kemudian disuling dengan 10 mL air suling dan disaring. Filtrat diencerkan dengan air suling hingga tidak berwarna. 2 mL larutan diambil dan ditambahkan 1-2 tetes reagen FeCl_3 1%. Jika muncul warna biru kehitaman atau hijau kehitaman, itu menunjukkan adanya tannin (Yuliani *et al.*, 2015).

4) Identifikasi Saponin

Timbang Sebanyak 0,1 g ekstrak daun daun bunga putih dilarutkan dalam 10 mL air suling dan dipanaskan. Larutan yang dipanaskan didinginkan lalu dikocok. Pembentukan busa setelah 30 detik pengocokan menunjukkan adanya saponin (Yuliana *et al.*, 2023).

c. Uji Kuantitatif Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

1) Pembuatan Larutan 2,2- diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Ditimbang Persiapan Larutan 2,2-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH): Timbang 10 mg bubuk DPPH dan larutkan dalam 50 mL larutan etanol 96%. Dilakukan penggojokan sampai larut sempurna. (Yuliana *et al.*, 2023)

2) Pembuatan Larutan Sampel Ektrak Kloroform Daun Bunga Putih

Ektrak kloroform daun bunga putih dibuat dengan konsentrasi 500 ppm. Serangkaian konsentrasi 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, dan 400 ppm disiapkan, masing-masing berisi 10 mL . Dari setiap konsentrasi larutan uji dipipet 4 ml ditempatkan dalam vial kemudian larutan ditambahkan DPPH 1 mL dan dihomogenkan. Selanjutnya di inkubasi dalam ruangan selama 30 menit lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm. (Muthia *et al.*, 2019).

3) Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

Ditimbang kuersetin sebanyak 10 mg lalu dilarutkan dengan etanol 96% menggunakan labu ukur 100 mL sampai tanda batas, sebagai larutan induk. Kuersetin dibuat dengan konstrasi 100 ppm Kemudian dibuat seri pengenceran dari 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm diukur 4 mL larutan kuersetin dan dipindahkan ke dalam vial kemudian, ditambahkan 1 mL larutan DPPH ke setiap vial. Campuran kemudian dihomogenkan dan diinkubasi dalam gelap selama 30 menit. Absorbansi kemudian diukur

menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) 516 nm.

4) Perhitungan nilai IC₅₀

Persentase inhibisi radikal DPPH dihitung dengan rumus :

$$\text{Persen inhibisi} = [A_o - A_s] / A_o \times 100\%$$

Dimana :

A_o : absorbansi blanko,

A_s : absorbansi mengandung sampel dan DPPH,

Nilai IC₅₀ merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji yang memberikan peredaman sebesar 50% (mampu menghambat atau meredam proses oksidasi sebesar 50%). Nilai IC₅₀ ditentukan dengan cara dibuat kurva linear antara konsentrasi larutan uji (sumbu x) dan % peredaman (sumbu y) dari persamaan $y = a + bx$ dapat dihitung nilai IC₅₀ dengan menggunakan rumus IC₅₀

Keterangan :

y : Persentase aktivitas antioksidan

a : Konsentrasi larutan uji

b : Tetapan intersep (perpotongan garis disumbu y)

9. Analisis data

Hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk menghitung persentase penangkapan radikal bebas DPPH. Persentase (%) penangkapan radikal bebas DPPH dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{c(\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel})}{\text{Abs blanko}} \times 100\%$$

Keterangan :

Abs blanko : serapan radikal DPPH 0,5 mM (milimolar)

Abs sampel : serapan sampel terhadap radikal 0,5 mM (milimolar)