

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Penelitian ini bertujuan untuk memberikan gambaran aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun bunga putih (*Clerodendrum costatum R.Br*) dan gambaran metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman daun bunga putih.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium kimia dan Instrumentasi Prodi Farmasi Politeknik Kesehatan Kupang, serta dilakukan pengujian menggunakan Spektrofotometri UV-Vis di Laboratorium Prodi DIII Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Desember sampai Januari Tahun 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman daun bunga putih (*Clerodendrum costatum R.Br.*) yang diambil dari Pulau Semau Desa Otan, Kabupaten untuk yaitu daun bunga putih yang diambil berwarna hijau tua dan masih segar.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun bunga putih (*Clerodendrum costatum R.Br.*).

D. Teknik Sampling

Teknik sampling merupakan proses atau cara mengambil sampel untuk menduga keadaan dari populasi yang akan kita teliti. Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah *Purposive Sampling* yaitu pengambilan sampel yang didasarkan pada pertimbangan dan karakteristik tertentu yaitu daun bunga putih yang diambil berwarna hijau tua dan masih segar.

E. Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah variabel tunggal yaitu aktivitas antioksidan tanaman daun bunga putih. Dengan melihat kandungan fitokimia yang terkandung didalam tanaman daun bunga putih, melihat aktivitas antioksidan tanaman daun bunga putih dengan seri konsentrasi 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm dan 60 ppm dan juga nilai IC_{50} pada tanaman daun bunga putih.

F. Defenisi Operasional

Tabel 2. Defenisi Operasional

No	Indikator Utama	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala
1	Aktivitas antioksidan	Kemampuan ekstrak etanol daun bunga putih dalam meredam radikal DPPH berdasarkan nilai IC ₅₀ dengan menggunakan Spektrofotometri UV-VIS	Spektrofotometer UV-Vis	Ratio
2	Daun Bunga (<i>Clerodendrum costatum R.Br.</i>)	Daun bunga putih (<i>Clerodendrum costatum R.Br.</i>) yang diambil dari Pulau Semau, Kab. Kupang NTT		Nominal
3	Ekstrak etanol	Ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi daun bunga putih <i>Clerodendrum costatum</i> menggunakan pelarut etanol 70%		Nominal
4	Metode DPPH	Metode yang digunakan untuk meredam radikal bebas untuk mengetahui aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 515 - 520 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 semakin kuat.	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio

G. Alat dan Bahan

1. 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, Kain Flanel, Tissue (Passeo), Aluminium foil.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun bunga putih (*Clerodendrum costatum* R.Br.) , radikal DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Kuersetin, Etanol 70% dan Etanol 95 %, HCL 2N, NaCl, Pereaksi mayer, wagner, bouchardat, n- heksana, HCL pekat, FeCL₃ 1%, Perekasi Liebermann bouchard.

H. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan serbuk simplisia daun bunga putih

Pada proses pembuatan simplisia bagian yang diambil ialah daunnya yang masih segar dan terlihat muda, yang ditandai dengan tanaman yang mulai berbunga. Untuk mengambil pucuk daun, dianjurkan diambil daun yang masih segar dan berwarna hijau tua. Daun disortasi awal, kemudian ditimbang daun bunga sebanyak 1 kg, setelah itu dicuci bersih, ditiriskan dan dikeringkan, proses pengeringan dilakukan dengan memanfaatkan sinar matahari secara tidak langsung yang ditutupi dengan kain berwarna hitam. Kemudian, ditimbang kembali berat daun setelah dikeringkan dan dihitung susut pengeringannya. Setelah itu, daun tersebut dirajang kecil-kecil, dihaluskan dengan cara diblender (Gunawan, Didik dan Mulyani, 2010). Pembuatan ekstrak sampel serbuk simplisia daun bunga putih *Clerodendrum costatum* diekstraksi dengan cara maserasi dengan

menggunakan pelarut etanol 70%. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 200 gram dan dimasukkan kedalam wadah kaca. Ditambahkan etanol 70% sebanyak 2000 ml. Serbuk simplisia daun bunga putih dan pelarut yang telah tercampur kemudian ditutup rapat dan terlindung sambil dari sinar matahari. Selanjutnya rendam selama 6 jam pertama sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan Filtrat dan residu dengan cara penyaringan yaitu dengan menggunakan corong yang telah dialasi dengan kain saring dan kertas saring kasar. Diulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut ang sama. Setelah diperoleh filtrat kemudian kumpulkan semua maserat kemudian diuapkan hingga diperoleh ekstrak yang kental (Farmakope Herbal Indonesia, Ekstrak yang didapatkan sebanyak 74,67 g.

2. Identifikasi kandungan senyawa fitokimia

a. Identifikasi alkaloid (Depkes, 1995)

1) Penyiapan ekstrak

Ekstrak sebanyak 0,3 gram ditambah 5 ml HCl 2 N, dipanaskan di atas penangas air selama 2-3 menit, sambil diaduk. Setelah dingin ditambah 0,3 gram NaCl, diaduk rata kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah 5 ml HCl 2 N dan dibagi menjadi empat bagian yang disebut sebagai larutan A, B, C, D.

2) Reaksi pengendapan

Larutan A ditambah pereaksi Mayer, larutan B ditambah dengan pereaksi Wagner, larutan C ditambah reagen bouchardat dan

larutan D dipakai sebagai blanko. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih dengan pereaksi Mayer, Endapan coklat dengan reagen Wagner dan endapan jingga dengan reagen Bouchardat.

b. Identifikasi Flavonoid (Markham, 1982)

1) Penyiapan sampel

Ekstrak 0,3 gram ekstrak dikocok dengan 3 ml n-heksana berkali-kali sampai ekstrak n heksana tidak berwarna. Residu dilarutkan dalam etanol dan dibagi menjadi 2 bagian, masing-masing disebut sebagai larutan B dan C.

2) Reaksi warna

a) Uji Wilstater

Larutan B sebagai blanko. Larutan C ditambah 0,5 ml HCl pekat dan serbuk magnesium. Diamati warna yang terjadi. Diencerkan dengan air suling, kemudian ditambahkan 1ml butanol. Diamati warna yang terjadi di setiap lapisan. Perubahan warna merah jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat menunjukkan adanya flavonol, merah tua menunjukkan adanya flavonon.

b) Identifikasi Tanin

Timbang 200 mg ekstrak larutkan dalam 5 mL air, panaskan hingga mendidih selanjutnya didinginkan dan disaring tambahkan 3 mL larutan FeCl_3 1%. Adanya kandungan tanin ditandai dengan timbulnya warna hijau gelap atau biru tua (Yuniarti, 2023).

c. Identifikasi saponin (Depkes RI, 1995)

1) Uji Busa

Timbang 500 mg sampel, masukkan dalam tabung reaksi. Tambahkan 10 mL air mendidih, kocok hingga berbusa. Ekstrak mengandung saponin jika busa tidak hilang setelah dibiarkan > 10 menit dan, busa tidak hilang dengan penambahan 1 tetes HCl 2 M. (Depkes RI, 1995)

2) Pereaksi Warna

Timbang 500 mg sampel, masukkan dalam tabung reaksi, tambah 5 ml kloroform, panaskan diatas tangas air sambil di kocok, dinginkan. 1 ml filtrat + pereaksi Liebermann Bouchard (3 tetes anhidrat asetat dengan 1 tetes asam sulfat pekat) diamati perubahan warna. (reaksi positif saponin yaitu merah, merah muda atau ungu dan biru perlahan-lahan menjadi hijau).

3. Uji antioksidan ekstrak daun bunga putih

a. Penyiapan larutan uji ekstrak daun bunga putih

Ekstrak daun bunga putih ditimbang sebanyak 50 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 95% PA didalam labu ukur 50 ml sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm kemudian dibuat pengenceran ke 100 ppm. Larutan ekstrak daun bunga putih dari larutan induk tersebut dibuat dengan seri konsentrasi pengenceran yaitu 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, dan 60 ppm.

b. Penyiapan larutan DPPH

Ditimbang serbuk DPPH sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 90% sampai tanda batas pada labu ukur 50 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 0,5 mM, yang dihitung terhadap BM DPPH sebesar 394,32 g/mol. Labu takar yang digunakan dilapisi aluminium foil dan disimpan terhindar dari cahaya matahari.

c. Penyiapan larutan pembanding

Larutan pembanding kuersetin, dibuat dengan ditimbang sebanyak 10 mg kuersetin dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml ditambahkan etanol 95% 5 ml dikocok hingga homogen dicukupkan dengan etanol 95% sampai tanda batas, sehingga didapat konsentrasi larutan kuersetin 200 ppm. Lalu dibuat larutan uji pembanding dengan konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm dengan dipipet sebanyak 0,125 ml, 0,25 ml, 0,375 ml, 0,5 ml dan 0,625 ml dari larutan induk dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml ditambahkan etanol 95% sampai tanda batas (Nathania *et al.*, 2020).

d. Penentuan panjang gelombang

Sebanyak 4 mL blanko yaitu etanol 95% dimasukkan kedalam vial, ditambahkan 1 mL larutan DPPH, lalu ditutup dan diukur pada Panjang gelombang 515-520 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

e. Absorbansi peredaman radikal DPPH

Blanko, larutan uji dan larutan pembanding yang dibuat dalam beberapa konsentrasi diambil sebanyak 4 mL ditambahkan 1 mL larutan DPPH

dimasukkan dalam vial lalu dikocok. Larutan didiamkan selama 30 menit, kemudian dibaca serapannya pada Panjang gelombang maksimum. Blanko yang digunakan adalah etanol 95%.

I. Analisis Data

Hasil pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk menghitung presentase peredaman radikal bebas DPPH. Persen (%) peredaman radikal bebas DPPH dihitung menggunakan rumus :

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

Keterangan :

Abs blanko : serapan radikal DPPH 0,5 mM

Abs sampel : serapan sampel terhadap radikal 0,5 mM

Daya aktivitas antioksidan peredaman radikal bebas DPPH (persentase peredaman), ekstrak etanol daun bunga putih (*Clerodendrum costatum R.Br.*) serta pembandingnya kuersetin, dianalisis dan masing-masing akan dihitung dengan nilai IC₅₀ dengan rumus analisis regresi linear

$$y = a + bx$$

Keterangan :

y : presentase aktivitas antioksidan

a : konsentrasi larutan uji

b : tetapan intersep (perpotongan garis disumbu y)

Kemudian hasil perhitungan dimasukkan kedalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak sebagai absis (sumbu x) dan nilai presentase peredaman (aktivitas antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu y). Hasil analisis regresi linear berupa nilai x, dapat dimasukkan kedalam rumus $IC_{50} = \text{anti Log}(x)$ dan ditentukan tingkat kekuatan antioksidannya.