

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan sampel daun kayu bulan (*Pisonia alba* Span.) dan merupakan jenis penelitian eksperimental. Sampel diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut metanol dan etanol hingga didapat ekstrak yang kental. Dua ekstrak kental tersebut kemudian diuji kandungan antioksidannya menggunakan dua metode yakni metode DPPH dan ABTS yang ditentukan dengan parameter IC₅₀.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Kimia Farmasi Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret hingga Juni 2023.

C. Sampel Penelitian

Daun kayu bulan (*Pisonia alba* Span.) segar berwarna hijau cerah yang diambil dari Desa Nyemengan RT 04, Kelurahan Tirtonirmolo, Kecamatan Kasihan, Kabupaten Bantul, DIY merupakan sampel yang digunakan dalam penelitian ini.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (*independent variable*)

Variasi pelarut metanol dan etanol serta metode uji antioksidan yaitu DPPH dan ABTS.

2. Variabel terikat (*dependent variable*)

Aktivitas antioksidan dari sampel daun kayu bulan (*P. alba* Span.) yang dinyatakan dengan parameter IC₅₀.

3. Variabel kontrol

Variabel yang dikendalikan atau dikontrol dalam penelitian ini adalah suhu pengeringan, waktu maserasi, bagian daun, dan kecepatan pengadukan.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak metanol daun kayu bulan adalah ekstrak yang diperoleh dari hasil maserasi daun kayu bulan dengan pelarut metanol.
2. Ekstrak etanol daun kayu bulan adalah ekstrak yang diperoleh dari hasil maserasi daun kayu bulan dengan pelarut etanol 96%.
3. Metode DPPH dan ABTS adalah metode yang digunakan guna mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak daun kayu bulan yang dinyatakan dengan parameter IC₅₀.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a. Alat-alat yang dipakai pada proses pengolahan ekstrak metanol dan etanol daun kayu bulan yaitu oven, grinder, timbangan analitik (Ohaus SW version 10S), tempat maserasi (botol kaca transparan), penangas air, alat gelas iwaki dan saringan.
 - b. Alat-alat yang digunakan pada proses pengujian aktivitas antioksidan yaitu alat gelas iwaki, timbangan analitik, spatula, vial, mikropipet, rak tabung reaksi, lap kain, stopwatch, dan spektrofotometer UV-Vis Genesys.
2. Bahan
 - a. Bahan berikut digunakan pada proses pembuatan ekstrak etanol dan ekstrak metanol daun kayu bulan yaitu daun kayu bulan, metanol, dan etanol.
 - b. Ekstrak metanol dan ekstrak etanol daun kayu bulan, metanol, etanol *p.a*, serbuk DPPH (Himedia), serbuk ABTS (Sigma), kalium persulfate,

kuersetin (Sigma), alumunium foil, akuades, kertas saring dan kertas label merupakan bahan yang digunakan pada analisis aktivitas antioksidan.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman kayu bulan (*P. alba* Span.) dilaksanakan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Preparasi sampel

Daun kayu bulan yang telah dikumpulkan dibersihkan kemudian diperkecil ukurannya dengan dirajang menjadi bagian-bagian kecil. Sampel kemudian di oven pada suhu 40°C. Sampel kering kemudian dihaluskan menggunakan grinder sampai berbentuk serbuk, kemudian diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh untuk menghasilkan serbuk yang lebih halus (Matheos *et al.*, 2014).

3. Ekstraksi sampel

Ekstraksi daun kayu bulan dilakukan menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:10 dalam dua pelarut yang berbeda yaitu metanol dan etanol. Sampel serbuk daun kayu bulan sebanyak 250 gram dalam bejana maserasi ditambahkan 2,5 L pelarut metanol dan 2,5 L pelarut etanol kedalam masing-masing bejana maserasi. Bejana ditutup rapat dan didiamkan selama 3 hari, simpan ditempat gelap terhindar dari sinar matahari langsung. Selama proses perendaman dilakukan beberapa kali pengadukan yaitu 3x24 jam untuk meningkatkan efektifitas difusi senyawa untuk terlarut ke dalam cairan penyari. Setelah perendaman selama 3 hari dilakukan penyaringan dan menghasilkan maserat pertama. Maserat tersebut kemudian dimasukkan kembali ke dalam bejana dan dilakukan sampai filtrat yang diperoleh tidak berwarna pekat. Kemudian filtrat diuapkan diatas penangas dengan suhu terkontrol 40°C hingga menghasilkan ekstrak kental dengan kadar air kurang dari 10% (Saritha B *et al.*, 2014).

4. Pembuatan larutan standar kuersetin

Kuersetin sejumlah 1 mg dilarutkan dengan etanol *p.a* 10 ml sehingga didapatkan konsentrasi 100 ppm. Seri konsentrasi 1, 3, 5, 7 dan 9 ppm dibuat untuk uji DPPH dan seri konsentrasi 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5 ppm untuk uji ABTS.

5. Pengujian aktivitas antioksidan

Metode DPPH dan ABTS adalah dua metode yang dipakai dalam uji antioksidan ekstrak metanol dan etanol daun kayu bulan.

a. Metode DPPH

1) Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM

Labu takar 100 mL yang ditutupi bagian luarnya dengan aluminium foil disiapkan terlebih dahulu, kemudian serbuk DPPH sebanyak 3,9 mg dilarutkan pada etanol *p.a*, larutan tersebut hendaknya digunakan segera dan dijaga pada suhu rendah serta terhindar dari cahaya.

2) Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH

Diambil larutan DPPH sejumlah 2 ml kemudian dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis absorbansinya pada rentang panjang gelombang 400-800 nm (Amelia & Pandapotan Nasution, 2022).

3) Penentuan *operating time* larutan DPPH

Diambil larutan DPPH sejumlah 2 ml ditambahkan 1 ml standar kuersetin dengan konsentrasi 5 ppm lalu dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis selama 60 menit dengan interval 1 menit dengan panjang gelombang maksimum yang didapatkan sebelumnya (Amelia & Pandapotan Nasution, 2022)

4) Pembuatan larutan uji

Ditimbang ekstrak metanol dan etanol daun kayu bulan masing-masing 125 mg kemudian dilarutkan masing-masing dengan pelarut yang sesuai yaitu metanol dan etanol *p.a* sebanyak 25 mL hingga didapatkan konsentrasi 5000 ppm. Seri konsentrasi dari masing-masing induk dibuat 500, 1000, 1500, 2000, dan 2500 ppm untuk ekstrak etanol

dan seri konsentrasi 250, 750, 1250, 1750 dan 2250 ppm untuk ekstrak metanol.

5) Pembuatan larutan blanko

Kedalam masing masing kuvet dimasukan etanol dan metanol, selanjutnya pembacaan absorbansi dilakukan pada panjang gelombang maksimum.

6) Pengujian aktivitas antioksidan larutan uji

Diambil 1 mL masing-masing dari konsentrasi larutan uji kuersetin, sampel ekstrak metanol dan sampel ekstrak etanol daun kayu bulan lalu ditambahkan larutan DPPH sejumlah 2 mL dalam labu takar 10 ml kemudian dicukupkan pelarut sampai tanda batas, pada suhu ruang dan dalam keadaan gelap larutan diinkubasi selama *operating time*. Menggunakan spektrofotometer UV-Vis absorbansi larutan dibaca menggunakan panjang gelombang maksimum dan dilakukan 3 kali (Amelia & Pandapotan Nasution, 2022).

b. Metode ABTS

1) Pembuatan larutan ABTS

Ditimbang serbuk ABTS sejumlah 19,2 mg lalu dilarutkan dengan pelarut metanol hingga 5 mL, kemudian ditimbang serbuk kalium persulfate 3,24 mg dan dilarutkan dengan aquades hingga 5 mL. Campurkan keduanya lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 12-16 jam sebelum digunakan. Sebelum digunakan larutan ABTS diencerkan terlebih dahulu dengan metanol hingga diperoleh absorbansi $0,70 \pm 0,02$ pada 734 nm (Shah & Modi, 2015).

2) Penentuan panjang gelombang maksimum larutan ABTS

Diambil larutan ABTS sejumlah 2 ml, kemudian dengan spektrofotometer UV-Vis absorbansi dibaca pada rentang panjang gelombang 650-800 nm.

3) Penentuan *operating time* larutan ABTS

Diambil larutan ABTS sebanyak 2 ml lalu absorbansinya dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis selama 60 menit dengan

interval 1 menit dengan panjang gelombang maksimum yang didapatkan sebelumnya.

4) Pembuatan larutan uji

Ditimbang ekstrak metanol dan etanol daun kayu bulan masing-masing 25 mg kemudian dibuat konsentrasi 1000 ppm dengan cara melarutkan masing-masing ekstrak menggunakan pelarut yang sesuai yaitu metanol dan etanol *p.a* sebanyak 25 mL. Larutan seri konsentrasi dibuat dari masing-masing induk 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm.

5) Pembuatan larutan blanko

Kedalam masing masing kuvet dimasukan etanol dan metanol kemudian absorbansinya dibaca pada panjang gelombang maksimum.

6) Pengujian aktivitas antioksidan larutan uji

Diambil 1 mL dari konsentrasi larutan uji kuersetin, sampel ekstrak metanol dan etanol daun kayu bulan lalu ditambahkan larutan ABTS sejumlah 2 mL, pada suhu ruang dan dalam keadaan gelap larutan diinkubasi selama *operating time*. Menggunakan spektrofotometer UV-Vis absorbansi larutan dibaca menggunakan panjang gelombang maksimum dan dilakukan sebanyak 3 kali.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan ABTS

Sebelum dilakukan perhitungan IC_{50} dihitung persen penangkapan radikal. Persen penangkapan radikal dihitung dari data absorbansi setiap sampel dan standar. Standar antioksidan yang dipakai adalah kuersetin. Rumus persen penangkapan radikal adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{(\text{absorbansi kontrol})} \times 100\%$$

Nilai parameter antioksidan IC_{50} dari dua metode yaitu DPPH dan ABTS dihitung menggunakan persamaan regresi linear hubungan antara konsentrasi sampel (sumbu x) dengan persen (%) penghambatan radikal (sumbu y). Setelah didapat hasil nilai IC_{50} , selanjutnya data dapat

diklasifikasikan ke dalam jenis antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} . Tingginya aktivitas antioksidannya ditandai dengan rendahnya nilai IC_{50}

2. Analisis statistika

Analisis dari data-data hasil penelitian dilakukan menggunakan SPSS. Uji Shapiro-Wilk dan uji Levene's digunakan untuk uji distribusi data dan uji homogenitas, karena data yang diperoleh baik pada metode DPPH ataupun ABTS adalah terdistribusi normal tetapi tidak homogen ditandai dengan nilai signifikansi $>0,05$ maka untuk mengetahui perbedaan antar 2 sampel dilakukan uji T (*T-test*) dengan taraf kepercayaan 95%.

PEPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YOGYAKARTA