

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan desain eksperimental yang bertujuan untuk menentukan pengaruh pengeringan dari SML, SMTL, dan Oven. Pengeringan SML, SMTL, dan Oven masing-masing diuji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH.

B. Lokasi dan Waktu

Pelaksanaan penelitian di Laboratorium Kimia Farmasi Prodi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2023 hingga bulan Juli tahun 2023.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan yaitu tanaman daun cocor bebek yang diperoleh dari penjual tanaman hias di Tlogo, Kebun Agung, Imogiri Daerah Istimewa Yogyakarta.

2. Sampel

Sampel tanaman yang digunakan sebanyak 1 kg dengan memperhatikan kriteria daun cocor bebek seperti daun yang berwarna hijau muda, segar, ujung daun tumpul, pangkal membulat.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Metode pengeringan SML, SMTL, dan Oven.

2. Variabel Terikat

Aktivitas peredaman radikal bebas DPPH berupa nilai IC₅₀.

3. Variabel Terkendali

Durasi pengeringan, warna daun, durasi ekstraksi.

E. Definisi Operasional

1. Daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata*) merupakan suatu cairan kental yang diperoleh dengan melarutkan serbuk dalam pelarut etanol melalui proses maserasi, kemudian dilakukan penguapan.
2. Pengeringan SML dilakukan di bawah sinar matahari selama 14 hari dan untuk kekeringan simplisia dilihat dengan menggunakan indikator kadar lembab.
3. Pengeringan SMTL dilakukan di bawah sinar matahari yang dibantu dengan menggunakan penutup kain hitam selama 17 hari dan untuk kekeringan simplisia dilihat dengan menggunakan indikator kadar lembab.
4. Pengeringan oven dilakukan di oven dengan suhu 50°C selama 4 hari dan untuk kekeringan simplisia dilihat dengan menggunakan indikator kadar lembab.
5. IC₅₀ yaitu suatu konsentrasi bahan antioksidan dalam menghambat 50% radikal bebas.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-VIS*), grinder (*Fomac*), ayakan 40 mesh (*Test Scieve*), rak tabung reaksi, *waterbath* (*Memmert*), tabung reaksi (*Iwaki Pyrex*), *beaker glass*, batang pengaduk, timbangan analitik (*Ohaus SW version 10S*), kaca arloji, toples kaca, labu takar, erlenmeyer (*Iwaki Pyrex*), mikropipet, *moisture balance analyzer* (*Ohaus*), oven (*Memmert UN55*), pipet tetes (*Iwaki Pyrex*), pipet ukur, propipet, *blue tip*, corong, vortex (*Ohaus*), aluminium foil.

2. Bahan

Ekstrak daun cocor bebek, kertas saring, sedangkan bahan kimia yang dipakai yaitu senyawa DPPH (*Himedia*), etanol teknis 70%, metanol *p.a* (*Emsure*), FeCl₃ (*Emsure*), HCl pekat (*Mallinckrodt*), serbuk magnesium (*Merck*), kloroform (*Emsure*), pereaksi (Mayer, Wagner, Dragendorff) dan standar Kuersetin (*Sigma*).

G. Metode Pengumpulan Data

1. Determinasi Daun Cocor Bebek

Determinasi merupakan langkah yang dilakukan untuk memastikan kebenaran sampel daun cocor bebek yang mana mencegah kesalahan dari pengumpulan bahan. Determinasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

2. Pembuatan Ekstrak dan Kontrol Kualitas Ekstrak

a. Persiapan Sampel

Dilakukan sortasi basah setelah sampel diperoleh untuk menghilangkan kotoran yang mungkin terbawa pada saat pemanenan, setelah itu daun cocor bebek dilakukan pencucian untuk menghilangkan kotoran yang melekat pada tanaman dan ditiriskan, kemudian daun dipotong menjadi beberapa bagian kecil-kecil dan dikeringkan dengan menggunakan metode pengeringan SML, pengeringan SMTL menggunakan kain hitam sebagai tabir sinar matahari, dan pengeringan Oven pada suhu 50°C. Simplisia yang sudah kering dicek kekeringannya secara visual dengan indikator kekeringan berupa simplisia yang mudah hancur ketika diremukkan, kemudian diserbuk menggunakan grinder. Serbuk yang sudah di grinder, diayak dengan ayakan 40 mesh.

b. Uji *Moisture Content*

1 gram serbuk daun cocor bebek dimasukkan kedalam cawan alumunium pada *moisture balance* dan diatur suhu menjadi 105°C. Nilai kadar akan muncul pada alat saat pengujian telah selesai. Nilai kadar air yang baik menurut Kemenkes (2017) yaitu tidak lebih dari 11%.

c. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak menggunakan metode maserasi, yang mana 50 gram serbuk daun cocor bebek dimasukkan ke dalam toples kaca dengan ditambahkan pelarut etanol 70% (1:10), kemudian diamkan selama 3 x 24 jam dan lakukan pengadukan sekali tiap 8 jam sekali. Hasil maserasi disaring hingga diperoleh filtrat 1. Ampas yang dihasilkan diremaserasi dengan pelarut etanol 70% dan didiamkan selama 1 x 24 jam dengan

sese kali diaduk. Hasil remaserasi disaring dan diperoleh filtrat 2. Filtrat yang didipat kemudian digabung dan diuapkan menggunakan penangas air untuk mendapatkan ekstrak kental. Hasil ekstrak kental yang diperoleh dilakukan perhitungan rendemen. Perhitungan rendemen dilakukan menggunakan persamaan (1).

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{ekstrak kental (g)}}{\text{serbuk simplisia (g)}} \times 100 \% \dots\dots\dots(1)$$

3. Karakteristik Ekstrak

a. Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik ekstrak daun cocor bebek dilakukan untuk mengetahui kualitas fisik secara kualitatif yang meliputi warna, tekstur, dan bau.

b. Skrining Fitokimia

1) Alkaloid

125 mg masing-masing ekstrak ditambah 2 mL HCl, kemudian dibagi menjadi 3 bagian dalam tabung reaksi. Tabung 1 ditetesi reagen Mayer sebanyak 2 tetes jika hasil positif membentuk endapan putih, tabung 2 ditetesi reagen Dragendroff sebanyak 2 tetes, hasil positif menunjukkan warna hijau kehitaman, dan tabung 3 ditetesi reagen Wagner sebanyak 2 tetes, hasil positif menunjukkan endapan warna kecoklatan. Ekstrak etanol daun cocor bebek dinyatakan positif mengandung alkaloid apabila dari 2 sampai 3 pereaksi menunjukkan adanya alkaloid (Fajrin, 2019).

2) Flavonoid

125 mg masing-masing ekstrak di tambahkan 2 mL etanol 70%, lalu diaduk, setelah itu ditambahkan serbuk magnesium 5 mg dan 3 tetes HCl pekat, jika terbentuk warna merah jingga, maka menunjukkan adanya flavonoid.

3) Tanin

125 mg masing-masing ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquadest 2 mL dan FeCl₃ 1% sebanyak

3 tetes, jika warna yang dihasilkan hijau/hijau kehitaman, maka menunjukkan positif mengandung tanin.

4) Fenol

125 mg masing-masing ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan FeCl_3 sebanyak 3 tetes, jika sampel mengandung fenolik akan mengalami perubahan hijau kehitaman.

4. Identifikasi Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Pembuatan Fase Gerak dan Penjenuhan Bejana

Pembuatan fase gerak dilakukan dengan mencampurkan kloroform, metanol, etil asetat dengan perbandingan (5 : 3 : 2) ke dalam bejana disertai dengan kertas saring yang berfungsi sebagai indikator kejenuhan. Tanda bejana telah jenuh dapat dilihat dari kertas saring yang dimasukkan sudah terbasahi oleh fase gerak (Nadalia, 2021). Pada penelitian ini menggunakan fase diam silika gel G F₂₅₄.

b. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dengan konsentrasi 1% dengan menimbang masing-masing 100 mg ekstrak yang kemudian dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a. Standar pembanding menggunakan kuersetin 0,1% dengan menimbang 10 mg kuersetin kemudian dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a, kemudian *divortex*.

c. Prosedur KLT

Diukur fase diam berupa plat silika gel dengan panjang dan lebar 10 x 4 cm yang ditandai garis masing-masing 1 cm pada bagian atas dan bagian bawah. Dimasukkan plat KLT ke dalam oven selama 30 menit pada suhu 100°C, hal ini bertujuan untuk mengaktivasi yang ada pada plat, dan menghilangkan kadar air di dalamnya, selanjutnya ditotolkan tiap sampel dan standar kuersetin di bagian bawah plat KLT dengan jarak 1 cm pada tiap totolan, kemudian plat KLT dimasukkan kedalam bejana dan ditutup rapat. Tunggu sampai eluen mulai naik, setelah itu plat KLT dikeringkan, lalu dilihat bercak dari sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 365 nm, setelah itu plat di semprot dengan AlCl_3 pereaksi yang bertujuan

untuk memperjelas bercak noda pada ekstrak dan standar kuersetin. Hasil yang didapatkan dihitung nilai *Retardation factor* (RF) menggunakan persamaan (2):

$$RF = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}} \dots\dots\dots(2)$$

5. Pengujian Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

Sebanyak 3,9 mg (BM 394,32) serbuk DPPH dilarutkan dengan 100 mL metanol p.a, sehingga diperoleh konsentrasi larutan induk 100 ppm. Larutan DPPH ditutup dengan alumunium foil.

b. Scanning Panjang Gelombang Maksimum

Sebanyak 4 mL larutan DPPH dimasukkan dalam labu takar, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-600 nm.

c. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *Operating time* memiliki tujuan mengidentifikasi titik pengukuran ketika absorbansi. Cara kerja *Operating time* yaitu diambil larutan DPPH sebanyak 3 mL, kemudian diukur absorbansi setiap menit selama 60 menit. *Operating time* ditentukan berdasarkan absorbansi yang stabil.

d. Pembuatan Serapan Blanko DPPH

1 mL larutan induk DPPH diambil, lalu didiamkan selama *operating time* yang sudah diperoleh dan diukur pada panjang gelombang maksimum 515 nm.

6. Pengujian Aktivitas Antioksidan Standar Kuersetin

a. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin 100 ppm

Dibuat larutan induk kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm dengan cara menimbang 10 mg dalam 100 mL metanol p.a.

b. Pembuatan Larutan Seri Kadar

Dibuat larutan seri kuersetin dengan konsentrasi dengan 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm kemudian larutan ini dibuat dengan cara masing-masing diambil 200 μ L, 400 μ L, 600 μ L, dan 800 μ L, dan 1000

μL , kemudian dimasukkan dalam labu takar 10 mL, setiap labu takar ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas.

c. Pengujian DPPH dan Kuersetin

Diambil larutan DPPH sebanyak 2000 μL kemudian ditambahkan standar kuersetin sebanyak 1000 μL , hingga volume campuran menjadi 3000 μL dimasukkan dalam tabung reaksi, selanjutnya untuk mengetahui absorbansinya, maka dapat diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

7. Pengujian Aktivitas Antioksidan Sampel

a. Pembuatan Larutan Induk Sampel 500 ppm

Ditimbang 50 mg masing-masing ekstrak cocor bebek, selanjutnya dilarutkan dalam 100 mL metanol p.a didalam labu takar.

b. Pembuatan Larutan Seri Kadar

Dibuat larutan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm dengan larutan ekstrak cocor bebek, kemudian larutan dipipet sebanyak 50 μL , 100 μL , 150 μL , 200 μL , dan 250 μL , lalu masukkan ke labu takar berukuran 5 mL, kemudian ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas.

c. Pengujian DPPH dan Sampel

Diambil larutan DPPH sebanyak 2000 μL kemudian ditambahkan ekstrak cocor bebek sebanyak 1000 μL dan dimasukkan dalam tabung reaksi, selanjutnya untuk mengetahui absorbansinya, maka dapat diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Nilai IC_{50} merupakan parameter yang digunakan untuk melihat kemampuan antioksidan dalam meredam radikal DPPH sebesar 50% aktivitas DPPH. Nilai IC_{50} ditentukan dengan cara menghitung % inhibisi. Perhitungan % inhibisi radikal bebas DPPH dapat dilihat pada persamaan (3).

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

Persamaan regresi linear didapatkan dari persentase inhibisi masing-masing perlakuan. Persamaan yang didapatkan yaitu $y = bx + a$, dimana x yaitu konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) dan y yaitu persentase inhibisi (%). Kategori aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Tabel 3.

Nilai IC_{50} yang diperoleh dari tiap ekstrak yang dihasilkan dari metode SML, SMTL, dan Oven dianalisis statistik menggunakan uji parametrik *ONE WAY ANOVA*.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA