

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu eksperimental laboratorium dengan sampel daun kayu bulan yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan 96%. Ekstrak kental hasil ekstraksi selanjutnya dilakukan pengujian antioksidan dengan metode DPPH dan ABTS.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian dimulai dari bulan April hingga Juli 2023.

C. Sampel Penelitian

Daun kayu bulan yang berwarna hijau kekuningan dari dusun Nyemengan, Tirtonirmolo, Kasihan, Bantul yang dipanen pada bulan April 2023.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas
Konsentrasi pelarut, seri kadar, metode analisis antioksidan.
2. Variabel terikat
Kandungan antioksidan pada daun kayu bulan (*Pisonia alba* Span).
3. Variabel terkontrol
Waktu maserasi, kecepatan pengadukan, *operating time*, suhu dan pengeringan sampel.

E. Definisi Operasional

1. Maserasi merupakan metode yang digunakan pada ekstraksi dengan perbandingan 1:10 pelarut etanol.
2. Konsentrasi yang dapat meredam 50% radikal bebas dapat dinyatakan dalam IC_{50} .
3. Konsentrasi pelarut etanol yang dibandingkan adalah 70% dan 96%.

F. Alat dan Bahan

1. Alat Penelitian

Timbangan analitik (Ohaus), pisau, grinder, ayakan 40 mesh, bejana maserasi (Toples), thermometer, saringan, botol ekstrak (Vial), kaca arloji, gelas ukur (Iwaki), erlenmeyer (Iwaki), beaker gelas (Iwaki), labu ukur (Iwaki), tabung reaksi (Iwaki), rak tabung, batang pengaduk, kompor listrik, panci, wajan, pengaduk kayu, sendok spatula, mikropipet (*Eppendorf*), pipet tetes, *hotplate magnetic stirrer*, spektrofotometer UV-Vis (*Thermo Scientific Genesys*), kuvet, *blue tip*.

2. Bahan Penelitian

Daun kayu bulan (*Pisonia alba* Span), pelarut etanol 70% *grade A* (teknis), pelarut etanol 96% *grade A* (teknis), serbuk DPPH (*1,1 difenil-2-pikrilhidrazil*), serbuk ABTS (*2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)*), kalium persulfat, kuersetin (Sigma-Aldrich), pelarut methanol (*p.a*), pelarut etanol (*p.a*), pelarut aquadest.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman daun kayu bulan (*Pisonia alba* Span.) dilaksanakan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Preparasi Sampel

Daun kayu bulan yang berwarna hijau kekuningan dicuci pada air mengalir. Disortasi basah dan dirajang menjadi bagian yang lebih kecil, lalu dikeringkan

dengan oven pada suhu 40⁰C hingga kering. Setelah kering daun kayu bulan dirajang menjadi ukuran yang lebih kecil. Kemudian dihaluskan dengan grinder dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh.

3. Ekstraksi Sampel

Sampel daun kayu bulan yang telah dipreparasi ditimbang sebanyak 250 gram lalu direndam pelarut etanol 70% dan 96% sebanyak 2,5 liter (1:10) dalam bejana maserasi. Ditungup bejana dan didiamkan selama 5 hari hingga daun kayu bulan terendam seluruhnya. Selama proses perendaman, dilakukan beberapa kali pengadukan untuk meningkatkan efektifitas difusi senyawa untuk terlarut dalam larutan penyari. Setelah 5 hari campuran ekstrak dengan pelarut di saring dan dihasilkan maserat yang pertama. Kemudian maserat dimasukkan kembali ke bejana dan dilakukan remaserasi. Dilakukan penguapan pada ekstrak kental diatas penangas dengan suhu terkontrol maksimal 50⁰C.

4. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

a. Pembuatan larutan DPPH (0,1 mM)

Ditimbang serbuk DPPH 3,9 mg dilarutkan pelarut etanol hingga 100 mL (0,1 mM) (Ikhrar *et al.*, 2019).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH

Diambil larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 4 mL diukur pada panjang gelombang 400-600 nm menggunakan spektrofotometer untuk mendapatkan λ maksimal dengan absorbansi tertinggi (Khasanah *et al.*, 2014).

c. *Operating time* larutan DPPH

Diambil sebanyak 2 mL larutan DPPH yang ditambahkan 1 mL sampel, dihomogenkan. Diukur absorbansinya dari waktu ke 0 sampai waktu 60 menit, dibaca tiap interval 5 menit dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Amelia Riska & Nasution, 2022).

d. Pembuatan larutan pembanding kuersetin

Dilarutkan kuersetin sebanyak 2,5 mg dengan etanol *p.a* hingga volume 25mL dan didapatkan konsentrasi dengan larutan induk kuarsetin 100 ppm. Kemudian

diambil dari larutan induk 100 ppm sejumlah 1000 μ L sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 10 ppm. Diambil dari konsentrasi 10 ppm sejumlah masing-masing 1000 μ L, 3000 μ L, 5000 μ L, 7000 μ L, dan 9000 μ L dilarutkan dengan etanol *p.a* untuk pembuatan seri di beberapa kadar 1, 3, 5, 7, dan 9 ppm (Suyatmi *et al.*, 2019).

e. Pengukuran absorbansi kuersetin

Pengukuran absorbansi kuersetin dilakukan dengan cara diambil 1 ml tiap konsentrasi kuersetin, ditambahkan 2 ml larutan DPPH lalu didiamkan selama *operating time*. Kemudian dibaca absorbansi dengan panjang gelombang maksimum. Pengukuran absorbansi kuersetin dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

f. Pembuatan kadar sampel

Ekstrak daun kayu bulan ditimbang sebanyak 50 mg dilarutkan dengan etanol *p.a* 10 mL didapatkan larutan induk 5000 ppm kemudian dibuat beberapa konsentrasi sebesar 500, 1000, 1500, 2000, dan 2500 ppm (Khasanah *et al.*, 2014).

g. Pengujian aktivitas antioksidan larutan uji dengan metode DPPH

Diambil sampel setiap konsentrasi sejumlah 1 mL, tambahkan 2 mL larutan DPPH 0,1 mM kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama *operatting time*. Dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimal dengan spektrofotometer UV-Vis.

5. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS

a. Pembuatan larutan ABTS

Ditimbang serbuk ABTS sebanyak 19,2 mg dilarutkan hingga 5 mL dengan pelarut metanol, kemudian ditimbang serbuk kalium persulfat 3,2 mg dilarutkan hingga 5 mL dengan aquadest. Campurkan kedua larutan tersebut, inkubasi selama 12 jam sebelum digunakan. Larutan ABTS yang telah diinkubasi di encerkan dengan metanol hingga diperoleh absorbansi $0,7 \pm 0,02$ pada 734 nm.

b. Penentuan panjang gelombang maksimal larutan ABTS

Diambil 1 ml larutan ABTS yang dicukupkan dengan larutan buffer dalam labu ukur 25 ml menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 700-750 nm untuk mendapatkan λ maksimal dengan absorbansi tertinggi (Raharjo *et al.*, 2022).

c. Penentuan *operating time* larutan ABTS

Dilakukan pengambilan 2 ml larutan ABTS ditambahkan 1 ml sampel, dihomogenkan. Diukur pada panjang gelombang maksimum hingga diperoleh absorbansi yang stabil dengan interval 1 menit. (Raharjo *et al.*, 2022).

d. Pembuatan larutan pembanding kuersetin

Dilartkan kuersetin sebanyak 2,5 mg dengan metanol *p.a* hingga volume 25 ml dan didapatkan konsentrasi larutan induk kuersetin 100 ppm. Kemudian diencerkan dengan diambil 1000 μ L sehingga didapatkan konsentrasi 10 ppm. Dari larutan konsentrasi 10 ppm diambil sejumlah 500 μ L, 1000 μ L, 1500 μ L, 2000 μ L, dan 2500 μ L dilarutkan dengan etanol *p.a* untuk pembuatan seri di beberapa kadar yaitu 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 ppm (Suyatmi *et al.*, 2019).

e. Pengukuran absorbansi kuersetin

Pengukuran absorbansi kuersetin dilakukan dengan cara diambil 1 ml tiap konsentrasi kuersetin, ditambahkan 2 ml larutan ABTS lalu dilakukan *operating time*. Kemudian dibaca absorbansi dengan panjang gelombang maksimum. Pengukuran absorbansi kuersetin dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

f. Pembuatan kadar sampel

Ditimbang ekstrak daun kayu bulan sebanyak 25 mg dilarutkan dengan methanol *p.a* sampai 25 ml sehingga diperoleh kadar 1% kemudian dibuat konsentrasi sebesar 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm (Khasanah *et al.*, 2014).

g. Pengujian aktivitas antioksidan larutan uji dengan ABTS

Diambil sampel setiap konsentrasi sejumlah 1 mL, ditambahkan 2 mL larutan ABTS 0,1 mM kocok hingga tercampur dan dilakukan *operating time* pada ruangan gelap. Absorbansi dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Perhitungan rendemen

Perhitungan rendemen ekstrak dilakukan untuk menentukan perbandingan berat ekstrak yang didapatkan dari suatu bahan terhadap berat awal bahan baku. Perhitungan presentase rendemen ekstrak dari simplisia daun kayu bulan dihitung dengan persamaan:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (g)}}{\text{bobot simplisia awal (g)}} \times 100\%$$

2. Perhitungan nilai IC₅₀

Aktivitas antioksidan ditentukan berlandaskan seberapa besar penangkapan radikal bebas melalui hasil persen penghambatan. Rumus perhitungan persen penghambatan yang digunakan sebagai berikut:

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{(\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi ekstrak})}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Dimana:

Absorbansi blanko tidak mengandung sampel.

Absorbansi ekstrak mengandung sampel ekstrak.

Nilai IC₅₀ dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear yang dinyatakan dalam hubungan antara konsentrasi sampel (sumbu x) dengan Persen (%) penghambatan (sumbu y). Hasil dari nilai IC₅₀ tersebut digunakan untuk mengetahui aktivitas sebuah peredaman radikal bebas yang tinggi pada pelarut ekstraksi etanol 70% dan 96% ekstrak daun kayu bulan menggunakan metode DPPH dan ABTS.

3. Analisis statistik

a. Analisis statistik DPPH

Data dianalisis secara statistik dengan menggunakan SPSS. Kemudian dilakukan uji homogenitas menggunakan uji Levene's dan normalitasnya dengan uji Shapiro-Wilk. Hasil data dikatakan homogen dan terdistribusi normal jika nilai signifikan $>0,05$ ($p>0,05$) dan dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95%. Jika hasil yang ditunjukkan antar sampel berbeda signifikansinya maka dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui sampel yang berbeda secara signifikan.

b. Analisis statistik ABTS

Data dianalisis secara statistik dengan menggunakan SPSS. Kemudian dilakukan uji homogenitas menggunakan uji Levene's dan normalitasnya dengan uji Shapiro-Wilk. Hasil data dikatakan homogen dan terdistribusi normal jika nilai signifikan $>0,05$ ($p>0,05$). Namun hasil data tidak terdapat perbedaan yang signifikan $>0,05$ atau salah satu dari kedua asumsi tidak memenuhi maka dapat dilanjutkan dengan uji *Kruskal wallis* dan uji *Pairwise Comparisons* untuk mengetahui sampel mana yang berbeda secara signifikan.