

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental untuk menentukan pengaruh cara pengeringan simplisia daun kupu-kupu yang menggunakan tiga metode pengeringan yaitu Oven, SML, dan SMTL yang masing-masing ekstrak akan diuji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

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

#### **C. Populasi dan Sampel**

##### 1. Populasi

Populasi yang digunakan yaitu tanaman daun kupu-kupu yang diperoleh dari Desa Ngawu, Kecamatan Playen Kabupaten Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta.

##### 2. Sampel

Sampel tanaman yang digunakan yaitu sebanyak 1,5 kilogram dengan memperhatikan kriteria daun seperti daun masih segar, masih muda dan tidak berlubang yang diambil pada bulan Mei.

#### **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas yaitu ekstrak daun kupu-kupu yang dibuat dengan metode pengeringan Oven, SML, dan SMTL.
2. Variabel terikat aktivitas peredaman radikal bebas DPPH berupa nilai  $IC_{50}$
3. Variabel terkontrol yaitu durasi pengeringan, durasi ekstraksi, daun segar, masih muda dan tidak berlubang.

### E. Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak etanol daun kupu-kupu merupakan suatu cairan kental yang diperoleh dengan melarutkan serbuk dalam pelarut etanol melalui proses maserasi, kemudian dilakukan penguapan.
2. Pengeringan Oven yaitu menggunakan suhu 40° selama 4 hari
3. Pengeringan SML yaitu dijemur dibawah sinar matahari langsung selama 5 hari dimulai dari jam 08.00-16.00 hingga diperoleh masa kering rapuh
4. Pengeringan SMTL yaitu dijemur dibawah sinar matahari tetapi ditutup dengan menggunakan kain hitam selama 7 hari dimulai dari jam 08.00-16.00 hingga diperoleh masa kering rapuh.
5. Nilai IC<sub>50</sub> adalah konsentrasi bahan antioksidan dalam menghambat 50% radikal bebas

### F. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat yang digunakan yaitu seperangkat alat Spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S UV-Vis), grinder, spatula, rak tabung reaksi (Iwaki Pyrex), penangas air, tabung reaksi (Iwaki Pyrex), *stopwatch*, kaca arloji, toples, labu takar (Iwaki Pyrex), *beaker glass*, mikropipet (Eppendorff), oven (Memmert), pipet tetes, pipet volume (Iwaki Pyrex), propipet, vortex (Ohaus).

#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu daun kupu-kupu, senyawa DPPH (2,2-diphenyl-pikrilhidrazil), etanol 70%, FeCl<sub>3</sub>, HCl, kertas saring, kloroform, metanol (*pro analisis*), etil asetat, pereaksi Wagner, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, standar kuersetin, serbuk magnesium.

### G. Pelaksanaan Penelitian

#### 1. Determinasi tanaman

Determinasi merupakan suatu langkah yang dilakukan untuk memastikan kebenaran sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L) dan mencegah kesalahan pengumpulan bahan penelitian.

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sistematika Tanaman Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

## 2. Pembuatan ekstrak dan kontrol kualitas ekstrak

### a. Persiapan sampel

Sampel yang diperoleh ditimbang sebanyak 500 gram tiap metode pengeringan, dan dicuci dengan air mengalir kemudian dikeringkan sampai daun benar-benar kering menggunakan metode pengeringan SML yaitu dibawah sinar matahari langsung dimulai dari jam 08.00-16.00 hingga diperoleh masa kering rapuh. Pada metode SMTL daun dijemur dibawah sinar matahari dengan cara diberi tabir kain berwarna hitam dimulai dari jam 08.00-16.00 hingga diperoleh masa kering rapuh. Pengeringan Oven dilakukan pada suhu 40°C hingga diperoleh masa kering rapuh. Sampel yang sudah kering kemudian ditimbang dan dihaluskan menggunakan grinder hingga diperoleh serbuk daun kupu-kupu dan diayak menggunakan ayakan dengan ukuran 40 mesh untuk menyamakan ukuran partikel. Serbuk daun kupu-kupu kemudian disimpan dalam wadah yang bersih.

### b. Uji *Moisture Content*

Dua gram masing-masing serbuk daun kupu-kupu dimasukkan kedalam cawan aluminium pada *moisture balance* dan diatur suhu menjadi 105°C. Nilai kadar akan muncul pada alat saat pengujian telah selesai (Handayani *et al.*, 2019). Nilai kadar air yang baik menurut Farmakope Herbal yaitu tidak lebih dari 11% (Depkes RI, 2000).

### c. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak menggunakan metode maserasi, yang mana serbuk daun kupu-kupu dimasukkan kedalam toples kaca dengan ditambahkan pelarut etanol 70% yaitu (1:10), kemudian diamkan selama 3x24 jam, sambil dilakukan pengadukkan tiap 8 jam. Hasil maserasi disaring hingga diperoleh filtrat 1. Ampas yang dihasilkan diremaserasi dengan pelarut etanol 70% dan didiamkan selama 1x24 jam dengan sekali diaduk. Hasil remaserasi disaring dan diperoleh filtrat 2. Hasil filtrat yang

didapatkan diuapkan dengan menggunakan penangas air pada suhu 50°C hingga menjadi ekstrak kental. Hasil ekstrak kental yang diperoleh dilakukan perhitungan rendemen. Perhitungan rendemen dilakukan persamaan (1).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Ekstrak kental (g)}}{\text{Serbuk simplisia (g)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

d. Uji organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan untuk mengetahui kualitas fisik ekstrak etanol 70% yang meliputi bau, tekstur, dan warna.

e. Skrining fitokimia

1) Alkaloid

Sebanyak 125 mg masing-masing ekstrak ditambahkan 2,5 mL HCl 2 N kemudian dibagi kedalam 3 tabung reaksi. Tabung 1 ditetesi reagen Dragendorf sebanyak 2 tetes jika didapatkan endapan merah-jingga maka menunjukkan hasil positif alkaloid, tabung 2 ditetesi reagen Mayer sebanyak 2 tetes hasil positif jika terdapat endapan putih, tabung 3 ditetesi Wagner 2 tetes hasil positif jika terdapat endapan colat (Mukhaimin *et al.*, 2018). Ekstrak daun kupu-kupu dinyatakan positif mengandung alkaloid apabila dari 2 sampai 3 pereaksi menunjukkan adanya alkaloid (Fajri, 2019 dengan modifikasi).

2) Flavonoid

Sebanyak 125 mg masing-masing ekstrak ditambahkan 2 mL etanol 70%, lalu diaduk, selanjutnya tambahkan magnesium 5 mg, dan 1 mL HCl pekat, jika di dapatkan warna kuning, orange hingga ungu, maka menunjukkan adanya flavonoid (Irawan *et al.*, 2020 dengan modifikasi).

3) Saponin

Sebanyak 125 mg ekstrak masing-masing ditambahkan 2 mL air, campuran tersebut dididihkan 5 menit, kemudian dimasukkan larutan ke tabung reaksi dan dikocok hingga homogen selamat 10 menit, lalu jika terdapat busa dan busanya tidak hilang setelah ditambah HCl

2N 1 tetes, maka menunjukkan adanya saponin (Febriani *et al.*, 2021 dengan modifikasi)

4) Tanin

125 mg masing-masing ekstrak dilarutkan dalam aquadest 2 mL kemudian dipanaskan selama 5 menit selanjutnya tambahkan 1 mL FeCl<sub>3</sub>. Lalu, jika terdapat warna hijau, ungu, merah, biru, atau hitam pekat menunjukkan adanya tanin (Febriani *et al.*, 2021 dengan modifikasi).

f. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

1) Pembuatan fase gerak dan penjenjangan bejana

Pembuatan fase gerak meliputi penambahan kloroform (nonpolar), metanol (polar), etil asetat (semi polar) dengan perbandingan (5:3:2). Selanjutnya dimasukkan ke dalam bejana beserta kertas saring sebagai indikator kejenuhan. Tunggu hingga bejana jenuh yang ditandai dengan kertas saring yang sudah basah oleh fase gerak. Penelitian ini menggunakan fase diam yaitu plat silika gel GF<sub>254</sub> yang mengandung gypsum sebagai pengikat (Nadalia, 2021)

2) Pembuatan larutan uji

Larutan uji dibuat dengan konsentrasi 1%, dengan menimbang masing-masing ekstrak 100 mg dengan pelarut metanol *p.a* sebanyak 10 mL. Standar pembanding dalam penelitian ini yaitu kuersetin 0,1 % dibuat dengan menimbang 10 mg kuersetin kemudian dilarutkan dalam 10 mL metanol *p.a* lalu divortex (Hendriana *et al.*, 2021).

3) Prosedur KLT

Plat KLT diukur dengan panjang dan lebar 10x4 cm, ditandai garis masing-masing 1 cm pada bagian atas dan bagian bawah. Setelah itu, plat KLT dimasukkan ke dalam oven dalam waktu 30 menit dengan suhu 100°C, untuk menghilangkan kadar air yang ada di dalam plat KLT. Setelah itu, ditotolkan larutan uji masing-masing dan standar kuersetin di bagian bawah fase diam dengan jarak ±1 cm pada tiap totolan (Fatmawati, 2019). Setelah bejana telah jenuh, dimasukkan fase diam ke dalam bejana

kemudian ditutup rapat sampai eluen mulai naik. Setelah itu plat KLT dikeringkan, lalu dilihat bercak pada sinar UV dengan panjang gelombang 254nm dan 365nm, kemudian disemprot dengan  $AlCl_3$  untuk memperjelas bercak noda pada ekstrak dan standar kuersetin. Bercak yang timbul ditandai dan dihitung *Retardation factor* (Rf) menggunakan persamaan (2) (Aryantini. 2021)

$$Rf = \frac{\text{Jarak Tempuh Ekstrak}}{\text{Jarak Tempuh Pelarut}} \dots\dots\dots(2)$$

g. Pengujian aktivitas antioksidan DPPH

1) Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM

Sebanyak 3,943 mg DPPH (BM 394,32 g/mol) dilarutkan dalam metanol p.a ad 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan induk 100 ppm. Selanjutnya labu ukur dibungkus menggunakan alumunium foil (Dipahayu, 2020).

2) *Scanning* panjang gelombang maksimal

Sebanyak 4 mL larutan DPPH dimasukkan kedalam labu takar, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-600 nm (Aryantini *et al.*, 2021).

3) Penentuan *Operating Time* (OT)

*Operating time* ditentukan dengan cara diambil 2 mL larutan DPPH direaksikan dengan 1 mL ekstrak kemudian diukur absorbansinya pada setiap menit selama 60 menit *Operating Time* ditentukan berdasarkan absorbansi yang stabil (Fauzi *et al.*, 2021).

4) Pembuatan serapan blanko DPPH

Sebanyak 1 mL larutan induk DPPH diambil, lalu didiamkan selama *Operating time* dan diukur pada panjang gelombang maksimum yang sudah didapatkan (Qonitah, 2020).

h. Pengujian aktivitas antioksidan standar kuersetin

1) Pembuatan larutan induk kuersetin 100 ppm

Dibuat larutan induk kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm dengan cara menimbang 10 mg ad 100 ml metanol p.a dan diaduk ad homogeny (Dipahayu, 2020)

2) Pembuatan larutan seri kadar

Dibuat larutan seri kuersetin dengan konsentrasi yaitu 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm. Larutan ini dibuat dengan cara masing-masing diambil 200 $\mu$ L, 400 $\mu$ L, 600 $\mu$ L, 800 $\mu$ L dan 1000  $\mu$ L dan ditambahkan metanol *pro analisis* sampai 10 mL dicampur hingga homogen (Dipahayu, 2020).

3) Pengujian DPPH dan Kuersetin

Larutan DPPH sebanyak 2000  $\mu$ l ditambahkan ekstrak daun kupu-kupu sebanyak 1000  $\mu$ l, volume campuran menjadi 3000  $\mu$ l didiamkan sesuai OT, lalu diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal.

i. Pengujian aktivitas antioksidan sampel

1) Pembuatan larutan induk sampel 500 ppm

Sebanyak 50 mg masing-masing ekstrak dilarutkan dengan metanol *pro-analisis* sebanyak 100 mL, selanjutnya dicampurkan hingga homogen (Wulandari, 2016).

2) Pembuatan larutan seri

Dibuat larutan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm dengan larutan ekstrak daun kupu-kupu, kemudian larutan dipipet sebanyak 50, 100, 150, 200, dan 250  $\mu$ l. Dimasukkan ke dalam labu takar berukuran 5 mL, lalu metanol p.a ditambahkan sampai tanda batas dan dihomogenkan (Wulandari, 2016)

3) Pengujian DPPH dan sampel

Larutan DPPH sebanyak 2000  $\mu$ l ditambahkan ekstrak daun kupu-kupu sebanyak 1000  $\mu$ l, volume campuran menjadi 3000  $\mu$ l

didiamkan sesuai OT , lalu diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada lamda maks yang telah ditentukan.

### H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Nilai IC<sub>50</sub> merupakan parameter yang digunakan untuk melihat kemampuan antioksidan dalam meredam radikal DPPH sebesar 50% aktivitas DPPH. Nilai IC<sub>50</sub> ditentukan dengan cara menghitung %Inhibisi. Perhitungan %Inhibisi radikal bebas DPPH dapat dilihat pada persamaan (3)

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol DPPH} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol DPPH}} \times 100\% \dots (3)$$

Persamaan regresi linear didapatkan dari persentase inhibisi masing masing perlakuan. Persamaannya yang didapatkan yaitu  $y=bx+a$ , dimana x adalah konsentrasi (ppm) dan y adalah persentase inhibisi (%) (Dewi *et al.*, 2014). Kategori kekuatan aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Tabel 2 (Dewi *et al.*, 2014).

**Tabel 2. Kategori Kekuatan Aktivitas Antioksidan**

<b>Kategori</b>	<b>Konsentrasi</b>
Sangat kuat	<50 µg/mL (IC <sub>50</sub> < 50 µg/mL)
Kuat	50 µg/mL < IC <sub>50</sub> <100 µg/mL
Sedang	100 µg/mL < IC <sub>50</sub> < 150 µg/mL
Lemah	150 µg/mL < IC <sub>50</sub> < 200 µg/mL
Sangat lemah	IC <sub>50</sub> > 200 µg/mL

Nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh dari tiap ekstrak yang dihasilkan dari metode Oven, SML dan SMTL diuji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* data disimpulkan normal apabila nilai signifikan >0,05 dan homogenitas menggunakan *Levene-test* data dapat disimpulkan normal apabila nilai signifikan >0,05 kemudian dianalisis statistic menggunakan uji parametik *One Way* terdapat perbedaan yang signifikan apabila sig <0,05 dan dilanjutkan dengan uji post hoc menggunakan *Bonferroni* untuk melihat perbedaan signifikan yang lebih spesifik pada sampel daun kupu-kupu.