

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Metode yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode DPPH (2,2 *diphenyl-1-pikrilhidrazil*) untuk menguji aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.). Proses pembuatan ekstrak etanol daun kupu-kupu menggunakan metode ekstraksi maserasi yaitu perendaman simplisia daun kupu-kupu selama 3 hari dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10 sampai ekstrak terendam dan dilakukan penyaringan. Filtrat dari penyaringan diuapkan menggunakan waterbath sampai didapat ekstrak kental. Ekstrak dilakukan uji kualitatif berupa uji organoleptik, uji penapisan fitokimia, dan uji KLT kemudian dilakukan uji kuantitatif berupa uji peredaman radikal bebas menggunakan DPPH dan di absorbansi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 515 nm untuk menghitung nilai IC₅₀.

B. Lokasi dan Waktu Kegiatan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2021 sampai dengan bulan Juni 2021.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi : daun kupu-kupu dipetik sebanyak-banyaknya hingga diperoleh untuk mendapatkan simplisia kering sebanyak 300 g.
2. Sampel : tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun tanaman tersebut. Daun yang digunakan dalam penelitian ini berupa daun muda dengan kriteria daun yang berwarna hijau muda (urutan ke-2 sampai 4 dari pucuk tanaman) dan memiliki ukuran yang sama ($\pm 5 - 7$ cm).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel utama
 - a. Variabel bebas : aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH
 - b. Variabel terikat : nilai aktivitas antioksidan (IC_{50}) pada ekstrak etanol daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.)
2. Variabel pengacau
 - a. Variabel terkendali : tempat tumbuh tanaman, waktu pemetikan, bobot daun yang digunakan.
 - b. Variabel tak terkendali : suhu kelembapan, cuaca lingkungan.

E. Definisi Operasional

1. Aktivitas antioksidan : kemampuan suatu ekstrak etanol daun kupu-kupu untuk menangkap suatu senyawa radikal
2. *Inhibitory concentration 50* (IC_{50}) : DPPH, nilai dosis ekstrak etanol daun kupu-kupu yang dapat menangkap radikal DPPH sebesar 50%.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan ayakan 40 mesh, batang pengaduk, grinder (*Fomac*), chamber KLT, *corong buchner*, gelas beaker (*Iwaki Pyrex*), gelas ukur (*Iwaki Pyrex*), kaca arloji, kompor listrik, labu takar (*Iwaki Pyrex*), mikropipet (*Eppendorf*), neraca analitik (*Ohaus*), oven, pipet tetes, pipet volume (*Iwaki Pyrex*), pipet ukur (*Iwaki Pyrex*), propipet, seperangkat alat Spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-Vis*), tabung reaksi (*Iwake Pyrex*), termometer, toples kaca/wadah maserasi, *vacuum buchner* (*Ohaus*), vortex (*Ohaus*).

2. Bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kupu-kupu muda yang diperoleh dari Desa Ngawu Kecamatan Playen Kabupaten Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah aquadest, etanol 70%, etanol p.a, methanol p.a, kertas saring, blue tip, yellow tip, white tip, kuersetin, tube 2 mL, asam askorbat (vitamin C), DPPH (2,2

diphenyl-1-pikrilhidrazil), plat *silica gel* 60 F₂₅₄, serbuk magnesium, asam klorida pekat, pereaksi wagner, pereaksi mayer, pereaksi dragendorf, FeCl₃, Toluene, Aseton, Asam Format.

3. Metode Pengumpulan Data

a. Pengambilan Bahan dan Determinasi Tanaman

Daun kupu-kupu ini diperoleh dari Desa Ngawu, Kecamatan Playen, Kabupaten Gunung Kidul. Daun kupu-kupu dipetik pada bulan Maret 2021, berupa daun muda dengan kriteria daun yang berwarna hijau muda (urutan ke- 2 sampai 4 dari pucuk tanaman) dan memiliki ukuran yang sama ($\pm 5 - 7$ cm). Kemudian dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

b. Penyiapan simplisia

Sampel daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) yang diperoleh disortasi basah kemudian ditimbang. Sampel daun kupu-kupu kemudian dicuci bersih dengan air mengalir lalu dikeringkan menggunakan oven pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$, sampai daun benar-benar kering ditandai jika diremas daun mudah hancur (± 2 hari). Sampel yang sudah kering kemudian ditimbang dan dihaluskan menggunakan grinder hingga diperoleh serbuk daun kupu-kupu dan diayak menggunakan ayakan dengan ukuran 40 mesh. Serbuk daun kupu-kupu kemudian disimpan dalam wadah yang bersih untuk dilakukan langkah selanjutnya.

c. Pembuatan ekstrak etanol

Metode yang digunakan berdasarkan penelitian (Syukur *et al.*, 2011) dan (Aryantini, 2021) dengan beberapa modifikasi :

Serbuk simplisia daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) ditimbang sebanyak ± 300 g (306,10 g) kemudian dimasukkan dalam wadah maserasi. Dimaserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:10 selama 3 hari dengan beberapa kali pengadukan (setiap 4 jam) dan dilakukan penyarian. Hasil penyarian (filtrat) tersebut di kumpulkan menjadi satu kemudian dipekatkan/diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu $50^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh ekstrak yang kental.

d. Uji Organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan menggunakan pancaindra untuk mengamati warna, aroma/bau, dan rasa dari sediaan sampel yang digunakan, kemudian dideskripsikan hasil secara kualitatif.

e. Orientasi Fase Gerak pada Profil Kromatografi Lapis Tipis untuk senyawa flavonoid

1) Penjenuhan bejana

Dilakukan penjenuhan bejana kromatografi menggunakan kertas saring 18 – 20 cm. Fase gerak yang digunakan :

Tabel 1. Orientasi Fase Gerak pada Kromatografi Lapis Tipis

Percobaan	Fase Gerak	Volume (mL)	Sumber
1	Toluene : Aseton : Asam Format	(4 : 4 : 2)	(Annegowda <i>et al.</i> , 2011)
2	Kloroform : Xylene : Asam Format	(8,5 : 1,5 : 4 tetes)	(Chanchal <i>et al.</i> , 2016)
3	Petroleum eter : Etil asetat	(4 : 6)	(Negi, Dave, & Agarwal, 2012)

Fase gerak tersebut dimasukkan ke dalam bejana dan kertas saring dengan tinggi 18 cm harus tercelup ke dalam larutan fase gerak hingga mencapai dasar bejana. Kemudian bejana ditutup kedap dan didiamkan hingga fase gerak tersebut jenuh ditandai dengan kertas saring tersebut terbasahi oleh fase gerak.

2) Pembuatan larutan uji

Dilakukan penimbangan ekstrak etanol daun kupu-kupu sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam 2 mL metanol. (Annegowda *et al.*, 2011). Pada uji KLT ekstrak etanol daun kupu-kupu menggunakan standar senyawa kuersetin sebagai pembanding.

3) Prosedur KLT

Pada uji KLT ini menggunakan fase diam berupa *silica gel* 60 F₂₅₄ berukuran 10 x 2 cm. Plat KLT ditotolkan ekstrak etanol daun kupu-kupu dan standar kuersetin (2 µL). Plat KLT dimasukkan kedalam bejana yang sudah jenuh kemudian ditutup dan tunggu hingga terelusi (\pm 20 menit). Keringkan plat KLT selama 10 menit di suhu ruang dan amati noda pada

plat KLT dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

f. Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk menganalisis senyawa flavonoid

1) Penjenuhan bejana

Lakukan penjenuhan bejana kromatografi menggunakan kertas saring 18 – 20 cm. Fase gerak yang digunakan yaitu toluene : aseton : asam format (4 : 4 : 2, v/v/v). Fase gerak tersebut dimasukkan ke dalam bejana dan kertas saring dengan tinggi 18 cm harus tercelup ke dalam larutan fase gerak hingga mencapai dasar bejana. Kemudian bejana ditutup kedap dan didiamkan hingga fase gerak tersebut jenuh ditandai dengan kertas saring tersebut terbasahi oleh fase gerak. (Annegowda *et al.*, 2011)

2) Pembuatan larutan uji

Dilakukan penimbangan ekstrak etanol daun kupu-kupu sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam 2 mL metanol. (Annegowda *et al.*, 2011). Pada uji KLT ekstrak etanol daun kupu-kupu menggunakan standar senyawa kuersetin sebagai pembanding.

3) Prosedur KLT

Pada uji KLT ini menggunakan fase diam berupa *silica gel 60 F₂₅₄* berukuran 10 x 2 cm. Plat KLT ditotolkan ekstrak etanol daun kupu-kupu dan standar kuersetin. Plat KLT dimasukkan kedalam bejana yang sudah jenuh kemudian ditutup dan tunggu hingga terelusi (\pm 20 menit). Keringkan plat KLT selama 10 menit di suhu ruang dan amati noda pada plat KLT dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Kemudian disemprotkan $AlCl_3$ dan diamati kembali. Hitung nilai *retardation factor* (Rf) pada plat KLT. (Annegowda, *et.al.*, 2011).

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh solut}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

g. Uji Penapisan Fitokimia

Pada uji penapisan fitokimia digunakan untuk mengetahui adanya metabolit sekunder pada ekstrak etanol daun kupu-kupu. Berikut beberapa senyawa metabolit sekunder yang dilakukan pada uji penapisan fitokimia :

1) Flavonoid

Pada identifikasi flavonoid, dilakukan uji *Shinoda* dengan sejumlah ekstrak ditambahkan serbuk magnesium kemudian diberikan 1-2 tetes HCl pekat. Apabila terbentuk warna merah maka menunjukkan hasil positif. (Dhanalakshmi & Krishnaveni, 2014)

2) Alkaloid

Pada identifikasi alkaloid, dilakukan menggunakan tiga pereaksi yaitu pereaksi *Wagner*, pereaksi *Mayer*, dan pereaksi *Dragendorf*. Dilakukan dengan sejumlah ekstrak kemudian dilarutkan dengan HCl 2N kemudian dibagi menjadi 3 tabung reaksi untuk uji menggunakan pereaksi wagner, pereaksi mayer, dan pereaksi dragendorf. Pada masing-masing tabung diberi beberapa tetes pereaksi hingga menunjukkan terjadinya perubahan. Pada uji wagner menunjukkan hasil positif apabila terbentuk warna coklat kemerahan, sedangkan uji mayer menunjukkan hasil positif apabila terbentuk endapan putih, dan uji dragendorf menunjukkan hasil positif apabila terbentuk endapan jingga. (Fadhli *et al.*, 2019)

3) Tanin

Pada identifikasi tanin, dilakukan dengan sejumlah ekstrak kemudian ditambahkan FeCl_3 lalu apabila terbentuk warna biru-kehitaman maka menunjukkan hasil positif. (Dhanalakshmi & Krishnaveni, 2014)

4) Saponin

Pada identifikasi saponin, dilakukan dengan sejumlah ekstrak dicampur dengan air (dikocok dengan kuat) hingga menimbulkan busa dan ditambahkan HCl 2N. (Dhanalakshmi & Krishnaveni, 2014)

h. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

Ditimbang DPPH (BM 394,32) sebanyak ± 1 mg kemudian dilarutkan dengan metanol *p.a* sampai tanda batas (ad) 25 mL dalam labu ukur 25 mL.

Kemudian digojog sampai homogen dan disimpan pada tempat yang gelap. (Molyneux, 2004)

i. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal DPPH dan *Operating Time*

Diambil DPPH 0,1 mM sebanyak 4 mL kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan menggunakan blanko (metanol *p.a.*) untuk dilakukan skrinning panjang gelombang sekitar 400 – 600 nm yang akan digunakan untuk mendapatkan absorbansi pada rentang $\pm 0,2 - 0,8$ menggunakan Spektrofotometer UV-Vis *single beam*, diamati hingga diperoleh panjang gelombang maksimal yaitu 515 nm. Dilakukan penentuan *operating time* (OT) pada rentang waktu 0 – 40 menit untuk menentukan waktu stabil reaksi DPPH sebagai radikal bebas, diamati hingga diperoleh waktu inkubasi selama 30 menit. (Fauzi *et al.*, 2021)

j. Pembuatan Larutan Baku Ekstrak Etanol Daun Kupu-kupu dan Vitamin C

Metode yang digunakan berdasarkan penelitian (Padmaja *et al.*, 2012) dengan beberapa modifikasi :

Dibuat larutan baku 10 ppm Vitamin dengan menimbang 1 mg vitamin C dan ditambahkan metanol sampai tanda batas (ad) 100 mL dalam labu ukur. Kemudian dibuat seri konsentrasi (dalam 5 mL) larutan 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, dan 8 ppm.

Dibuat larutan baku 500 ppm Ekstrak dengan menimbang 5 mg ekstrak etanol daun kupu-kupu dan ditambahkan metanol sampai tanda batas (ad) 10 mL dalam labu ukur. Kemudian dibuat seri konsentrasi (dalam 5 mL) larutan 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, dan 400 ppm.

k. Orientasi Larutan Uji Peredaman Radikal Bebas pada Vitamin C

Pada tahap ini dilakukan dengan mencampurkan 4 mL DPPH 0,1 mM kemudian ditambahkan 50 μ L larutan seri konsentrasi vitamin C terendah (2 ppm) maupun tertinggi (8 ppm). Selanjutnya didiamkan dalam waktu tertentu yaitu selama 30 menit (*Operating Time*) pada tempat/wadah gelap, kemudian diabsorbansi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis *single beam* pada

panjang gelombang maksimum yaitu 515 nm dengan metanol *p.a.* sebagai blanko.

l. Pembuatan Larutan Uji Peredaman Radikal Bebas pada Vitamin C

Metode yang digunakan berdasarkan penelitian (Fauzi *et al.*, 2021) :

Tahap uji perendaman radikal bebas pada vitamin C, dilakukan dengan mencampurkan 4 mL DPPH 0,1 mM ditambahkan 50 μ L larutan masing-masing seri konsentrasi (2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, dan 8 ppm). Selanjutnya didiamkan dalam waktu tertentu yaitu selama 30 menit (*Operating Time*) pada tempat/wadah gelap, kemudian diabsorbansi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis *single beam* pada panjang gelombang maksimum yaitu 515 nm dengan metanol *p.a.* sebagai blanko. Kemudian dilakukan replikasi 3 kali.

m. Orientasi Larutan Uji Peredaman Radikal Bebas pada Ekstrak Etanol Daun Kupu-kupu

Pada tahap ini dilakukan dengan mencampurkan 4 mL DPPH 0,1 mM kemudian ditambahkan 50 μ L larutan seri konsentrasi sampel terendah (25 ppm) maupun tertinggi (400 ppm). Selanjutnya didiamkan dalam waktu tertentu yaitu selama 30 menit (*Operating Time*) pada tempat/wadah gelap, kemudian diabsorbansi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis *single beam* pada panjang gelombang maksimum yaitu 515 nm dengan metanol *p.a.* sebagai blanko.

n. Pembuatan Larutan Uji Peredaman Radikal Bebas Ekstrak Etanol Daun Kupu-kupu

Metode yang digunakan berdasarkan penelitian (Fauzi *et al.*, 2021) :

Tahap uji perendaman radikal bebas pada sampel, dilakukan dengan mencampurkan 4 mL DPPH 0,1 mM ditambahkan 50 μ L larutan masing-masing seri konsentrasi (25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, dan 400 ppm). Selanjutnya didiamkan dalam waktu tertentu yaitu selama 30 menit (*Operating Time*) pada tempat/wadah gelap, kemudian diabsorbansi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis *single beam* pada panjang

gelombang maksimum yaitu 515 nm dengan metanol *p.a.* sebagai blanko. Kemudian dilakukan replikasi 3 kali.

G. Pelaksanaan Penelitian

Tabel 2. Pelaksanaan Penelitian

No	Kegiatan Penelitian	Bulan							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	Persiapan proposal								
2	Penyusunan proposal								
3	Pengajuan judul proposal								
4	Pengajuan ujian proposal								
5	Ujian proposal								
6	Persiapan sampel								
7	Proses ekstraksi								
8	Pengujian organoleptis								
9	Pengujian Penapisan Fitokimia								
10	Pengujian Profil KLT								
11	Pengujian Antioksidan								
12	Pengolahan Data Dan Analisis Data								
13	Penyusunan laporan hasil penelitian								
14	Revisi hasil penelitian								
15	Sidang Hasil penelitian								
16	Revisi laporan hasil sidang								

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Analisis Data Penentuan Nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*)

Parameter yang digunakan untuk mengetahui uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH ini menggunakan nilai IC₅₀ (*Inhibitor Concentration* 50%) yaitu konsentrasi yang dapat menyebabkan hilangnya aktivitas DPPH sebesar 50%. (Molyneux, 2004). Untuk Perhitungan nilai IC₅₀ yang diperlukan yaitu data persen inhibisi dari pengujian. Persen inhibisi dihitung menggunakan rumus, sebagai berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

(Ghosal & Mandal, 2012)

Konsentrasi sampel dan persen inhibisi yang diperoleh dari masing-masing sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Persamaan ini digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dari masing-masing sampel dengan nilai y yaitu 50 dan nilai x sebagai IC_{50} . (Nurjanah, Izzati, & Abdullah, 2011).

Menurut (Rosidah & Tjitraresmi, 2018) terdapat klasifikasi antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} :

Tabel 3. Klasifikasi Antioksidan berdasarkan nilai IC_{50}

Nilai IC_{50}	Antioksidan
< 50 $\mu\text{g/mL}$	Sangat kuat
50 – 100 $\mu\text{g/mL}$	Kuat
101 – 250 $\mu\text{g/mL}$	Sedang
250 – 500 $\mu\text{g/mL}$	Lemah
>500 $\mu\text{g/mL}$	Tidak aktif

2. Analisis Data Statistik

Analisis data uji yang sudah diperoleh dari nilai IC_{50} dianalisis secara uji statistik menggunakan software *SPSS* untuk mengetahui data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak dengan melakukan uji normalitas dan homogenitas. Hasil uji normalitas dapat dilihat kesignifikan ($p > 0,05$) dari nilai IC_{50} ekstrak etanol daun kupu-kupu dan nilai IC_{50} vitamin C menggunakan metode *Shapiro-Wilk* sedangkan uji homogenitas dilakukan menggunakan *Levene test* dengan dilihat nilai signifikan ($p > 0,05$). Apabila sudah terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan menggunakan uji statistik T-test. Uji statistik *T-test* dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan antara sampel dengan standar yang berbeda dengan hasil nilai signifikan ($p < 0,05$).