

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental untuk menentukan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dari ekstrak metanol fuli pala (*Myristica fragrans* Houtt).

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Waktu pelaksanaan adalah bulan Juni 2024 hingga Agustus 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah buah pala (*Myristica fragrans* Houtt) yang berwarna coklat tua dan berasal dari Kelurahan Gurabati, Kecamatan Tidore Selatan, Kota Tidore Kepulauan, Provinsi. Maluku Utara.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah fuli pala yang merupakan bagian dari buah pala (*Myristica fragrans* Houtt). Fuli pala yang digunakan adalah yang berwarna merah karena berasal dari buah pala yang sudah tua.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak metanol fuli pala (*Myristica fragrans* Houtt)
2. Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai IC₅₀
3. Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu suhu pengeringan, warna fuli pala dan waktu ekstraksi.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak metanol fuli pala merupakan suatu cairan kental yang diperoleh dengan melarutkan serbuk dalam pelarut metanol melalui proses maserasi, kemudian dilakukan proses penguapan
2. Nilai IC_{50} adalah parameter yang menunjukkan konsentrasi terendah dari senyawa antioksidan yang bisa meredam radikal bebas DPPH.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
Ayakan no. 40, *beakerglass* (Iwaki), corong, gelas ukur (Iwaki), grinder, kaca arloji, mikro pipet, *moisture balance*, oven, kompor listrik, lampu Uv, penggaris, wajan, spektrofotometer Uv-Vis (Genesys 10S UV-Vis *Spectrophotometer*), tabung reaksi (*Pyrex Iwaki*), rak tabung reaksi, timbangan analitik (*Ohaus*)
2. Bahan
 $AlCl_3$, akuades, asam sulfat pekat, air panas, aluminium foil, asam klorida, asam asetat glasial, *blue tip*, fuli pala, $FeCl_3$, HCl 2N, kuersetin, metanol (p.a), metanol (teknis), n-butanol, NaOH 2N, plat silika F_{254} pereaksi Bauchardat, pereaksi Dragendrof, pereaksi Mayer, serbuk magnesium.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman
Determinasi fuli pala (*Myristica Fragrans* Houtt) dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan keaslian dari simplisia fuli pala yang akan digunakan pada penelitian. Bagian yang digunakan untuk proses determinasi adalah daun, buah pala, biji, fuli dan ranting.
2. Persiapan Sampel
Fuli pala dicuci pada air yang mengalir, kemudian ditiriskan dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu $50^{\circ}C$ hingga simplisia kering. Pengeringan bertujuan untuk menghilangkan air yang ada pada sampel.

Setelah fuli pala kering, dilakukan penyerbukan menggunakan grinder hingga diperoleh serbuk simplisia, kemudian dilakukan pengayakan dengan menggunakan ayakan nomor 40 mesh (Erza *et al.*, 2022)

3. Ekstraksi Fuli Pala

Sebanyak 200 gram serbuk fuli pala dimaserasi dengan metanol sebanyak 2 Liter dengan perbandingan 1:10 selama 3x24 jam. Bejana yang berisi maserat diaduk 8 jam sekali, selanjutnya hasil maserasi disaring dan didapatkan filtrat 1. Ampas diremaserasi dengan metanol sebanyak 1 Liter dan didiamkan selama 1x24 jam dengan sesekali diaduk. Hasil remaserasi disaring dan diperoleh filtrat 2, selanjutnya kedua filtrat dicampur dan dipekatkan dengan suhu 60°C untuk memperoleh ekstrak kental. Rendemen dapat dihitung berdasarkan ekstrak kental yang diperoleh. Perhitungan rendemen dilakukan menggunakan persamaan (1) (Chairunnisa *et al.*, 2019).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (gram)}}{\text{berat serbuk simplisia}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

4. Karakteristik Ekstrak Metanol Fuli Pala

a. Uji organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan mengamati secara fisik ekstrak metanol fuli pala, meliputi aroma, warna dan tekstur dari sampel ekstrak metanol fuli pala menggunakan panca indra (Leba *et al.*, 2022).

b. Uji kadar air

2 gram ekstrak dimasukkan kedalam *moisture balance* dengan suhu 105°C. Pengujian ini bertujuan untuk menentukan jumlah air yang terkandung dalam sampel ekstrak tersebut, kemudian diamati perubahan berat sampel selama proses pengeringan. Perubahan berat ini akan mencerminkan jumlah air yang terdapat dalam ekstrak tersebut (Djaeni *et al.*, 2013).

c. Skrining fitokimia

1) Uji flavonoid

40 mg ekstrak dilarutkan dengan 10 mL air panas. Tabung dipanaskan selama 5 menit, selanjutnya 0.05 mL magnesium dan 1 mL HCl ditambahkan. Perubahan larutan menjadi berwarna merah, menunjukkan adanya flavonoid (Putri *et al.*, 2023).

2) Uji fenolik

40 mg ekstrak fuli pala dilarutkan dengan 10 mL akuades, kemudian campuran dipanaskan selama 5 menit dan disaring. 5 mL filtrat diambil dan ditambahkan 10 tetes FeCl_3 . Hasil berupa warna hitam pekat menunjukkan adanya fenolik (Putri *et al.*, 2023)

3) Uji alkaloid

0,5 gram ekstrak ditambah dengan 9 mL akuades dan 1 mL HCl 2 N. lalu larutan dipanaskan selama 2 menit dan disaring. Masing-masing tabung diberi 3 tetes filtrat. Lalu masing-masing tabung ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, pereaksi Bouchardat, dan pereaksi Dragendorf. Jika positif mengandung alkaloid maka akan terdapat endapan putih atau kuning pada penambahan pereaksi Mayer, terdapat endapan berwarna coklat hingga hitam pada penambahan pereaksi Bouchardat, pada penambahan Dragendorf berupa endapan kuning jingga. Apabila 2 dari 3 reaksi tersebut positif, maka dapat dikatakan ekstrak mengandung alkaloid (Fatwami & Royani, 2023).

4) Uji saponin

Sebanyak 40 mg ekstrak diambil, dan ditambahkan 10 mL akuades ke dalam tabung reaksi. Lalu dikocok selama 10 detik, dan diukur tinggi busa yang dihasilkan. selanjutnya 1 tetes HCL 2N ditambahkan kedalam tabung. Hasil positif mengandung saponin apabila buih tersebut tidak hilang (Fatmawati *et al.*, 2021).

5) Uji tanin

Sebanyak 40 mg ekstrak dilarutkan ke dalam 4 mL air. Kemudian 2 mL ekstrak diambil, lalu FeCl_3 ditambahkan sebanyak 2 tetes. Hasil positif mengandung tanin jika terjadi perubahan hitam kehijauan pada larutan (Anita *et al.*, 2021).

5. Pengujian KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Pengujian KLT dilakukan untuk mengidentifikasi suatu senyawa yang terkandung dalam ekstrak fuli pala secara kualitatif, yaitu dengan membandingkan nilai R_f standar pembanding dengan R_f sampel (Husa & Mita, 2020).

a. Penjenuhan bejana

Penjenuhan bejana menggunakan fase gerak kloroform:etil asetat: asam asetat glasial (5:4:1) sebanyak 10 mL dan dijenuhkan. Dimasukan ke dalam bejana, lalu dimasukan kertas saring ke dalam bejana dan ditutup hingga rapat kemudian dibiarkan kertas saring basah oleh fase gerak sampai atas untuk menandakan jika bejana telah jenuh (Rifai *et al.*, 2019)

b. Pembuatan larutan uji ekstrak metanol fuli pala (5%)

Dilakukan penimbangan 0,25 gram ekstrak metanol fuli pala, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sebanyak 5 mL, lalu divortex dan disaring menggunakan kertas saring (Pratiwi *et al.*, 2019).

c. Pembuatan larutan standar kuersetin (0,1%)

Ditimbang standar kuersetin sebanyak 0,01 gram lalu dilarutkan dengan metanol p.a sampai 10 mL (Asmorowati & Lindawati, 2019).

d. Prosedur KLT

Dibuat fase diam berupa silika gel dengan ukuran panjang 10x2 cm dengan panjang garis bagian atas dan bagian bawah 1 cm. Dimasukan plat KLT didalam oven dengan suhu 100°C selama 30 menit. Tujuan plat KLT dipanaskan agar kandungan air pada plat tersebut berkurang. Sampel dan standar ditotolkan menggunakan *whitetip* pada plat silika kemudian dimasukan ke dalam bejana yang sebelumnya telah di jenuhkan terlebih dahulu, kemudian didiamkan hingga eluen sampai pada batas yang telah ditentukan, dan plat silika dikeluarkan dan dianginkan sampai kering, kemudian diamati dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 365 nm, kemudian disemprotkan $AlCl_3$ 5% untuk identifikasi flavonoid sebagai penampak bercak lalu diamati

kembali dibawah sinar UV dengan melihat noda yang ada pada lempeng kemudian tentukan nilai Rf dengan menggunakan persamaan (2) (Hasan *et al.*, 2023).

$$R_f : \frac{\text{jarak tempuh analit}}{\text{jarak tempuh pelarut}} \dots\dots\dots(2)$$

6. Pengujian Antioksidan

a. Pembuatan larutan DPPH (0,1 mM)

Ditimbang sebanyak 3,943 mg serbuk DPPH kemudian dilarutkan dengan 100 mL metanol *p.a* dalam labu ukur 100 mL sampai pada tanda batas, larutan DPPH ditutup menggunakan alumunium foil, sehingga diperoleh larutan induk 100 ppm (Alimuddin *et al.*, 2023).

b. Penentuan panjang gelombang

Penentuan panjang gelombang maksimum dengan diambil 2 mL larutan DPPH 0,1 mM, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian diukur absorbansinya pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. (Sugiyanti, 2022). Hasil panjang gelombang maksimal yang didapatkan adalah 516 nm.

c. Penentuan *operating time*

Diambil 2 mL larutan DPPH kemudian ditambahkan 1 mL larutan pembanding kuersetin diamati absorbansinya selama 60 menit. *Operating time* ditentukan setiap menit berdasarkan absorbansi yang stabil (Patria & Soegihardjo, 2013). Hasil *operating time* yang didapatkan adalah pada menit ke-30.

d. Pengukuran serapan blanko DPPH

Diambil 2 mL larutan DPPH kemudian di diamkan selama 30 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm. (Sari *et al.*, 2021)

e. Pembuatan larutan standar kuersetin (100 ppm)

1) Pembuatan larutan induk standar kuersetin dengan ditimbang 1 mg kuersetin kemudian dilarutkan dengan 10 mL metanol *p.a* dan dikocok hingga homogen (M & Kurniawan, 2023)

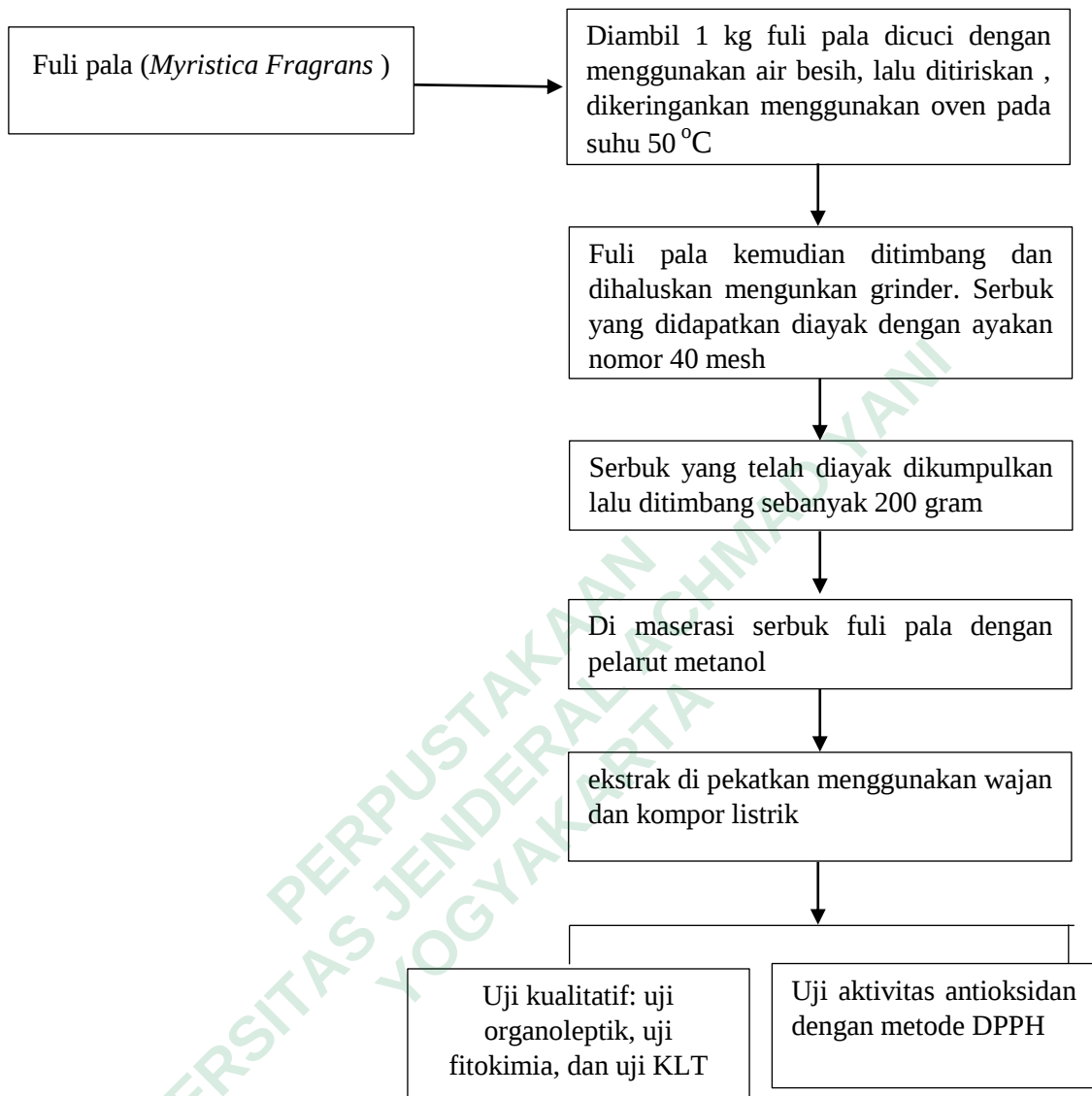
- 2) Larutan seri kadar kuersetin dengan konsentrasi yang bervariasi yaitu 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm, dan 9 ppm, kemudian masukan larutan induk kedalam labu ukur 5 mL dengan menggunakan mikropipet masing-masing sebanyak 50 μ l, 150 μ l, 250 μ l, 350 μ l, dan 450 μ l dimasukan kedalam labu ukur dan di add metanol 5 mL lalu dihomogenkan, kemudian di lakukan 3 kali replikasi yang bertujuan untuk mencegah kesalahan (Ilmiana, 2022).
- f. Pembuatan larutan sampel ekstrak metanol fuli pala (100 ppm)
- 1) Pembuatan larutan induk sampel dengan ditimbang 10 mg ekstrak kemudian dilarutkan dengan 100 mL metanol p.a dan dikocok hingga homogen (Alimuddin *et al.*, 2023).
 - 2) Larutan seri kadar dengan konsentrasi yang bervariasi yaitu 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm, dalam labu ukur 10 mL dengan menggunakan mikropipet masing-masing sebanyak 1000 μ l, 2000 μ l, 3000 μ l, 4000 μ l, dan 5000 μ l, dimasukan kedalam labu ukur dan di add metanol p.a 10 mL lalu dihomogenkan, kemudian di lakukan 3 kali replikasi yang bertujuan untuk mencegah kesalahan (Hidayati *et al.*, 2022)
- g. Pengujian kuersetin dengan DPPH
- Diambil larutan seri masing-masing 1000 μ L masukan kedalam tabung rekasi kemudian ditambahkan 2000 μ L DPPH. Ditutup dengan menggunakan alumunium foil dan didiamkan selama *operating time* yaitu 30 menit, kemudian diukur absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang yang didapatkan yaitu 516 nm (Hidayati *et al.*, 2022).
- h. Pengujian sampel dengan DPPH
- Diambil larutan sampel ekstrak metanol fuli pala sebanyak 1000 μ l masukan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2000 μ l DPPH. Diinkubasi sesuai waktu *operating time* yaitu 30 menit kemudian diukur absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang yang didapatkan yaitu 516 nm (Wulan *et al.*, 2019).

H. Pengolahan Data

Nilai IC_{50} merupakan parameter yang digunakan untuk melihat kemampuan antioksidan dalam meredam radikal bebas. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin tinggi aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan diukur dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH. Perhitungan % inhibisi radikal bebas DPPH dapat dilihat pada persamaan (3)

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

Setelah menghitung nilai persen inhibisi dan didapatkan konsentrasi sampel dan persen inhibisi maka selanjutnya dihitung nilai regresi liniernya, nilai x adalah konsentrasi dan nilai y adalah persentase aktivitas. Rumus $y = bx + a$ diperoleh dari perhitungan regresi linier. y adalah 50 sehingga diperoleh nilai x. Analisis data statistik yaitu nilai IC_{50} yang telah diperoleh dari analisis data yang diuji secara statistik menggunakan software *Statistical Analysis Software* (SPSS). Pengujian normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*, jika nilai $> 0,05$ maka data terdistribusi normal. Pengujian homogenitas dilakukan dengan uji *Levene*, jika nilai $> 0,05$ maka data homogen. Pengujian signifikansi dilakukan dengan uji *t-test*, jika nilai $< 0,05$ maka data berbeda signifikan.



Gambar 6. Skema Kerja