

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian uji eksperimental laboratorium dengan pendekatan penelitian kualitatif dan kuantitatif untuk menentukan pengaruh metode ekstraksi terhadap aktivitas peredaman radikal bebas DPPH ekstrak etanol 70% daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) menggunakan 2 metode ekstraksi yaitu maserasi dan *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE).

B. Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi, Program Studi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian ini akan dilaksanakan bulan Mei - Juli 2024.

C. Populasi Dan Sampel Daun Nangka

1. Populasi

Sampel daun nangka diambil dari kebun warga untuk memperoleh sampel daun nangka sebagai subjek penelitian yang didapatkan dari desa Karangawen, Girisubo, Gunung Kidul, Yogyakarta.

2. Sampel

Daun yang dibutuhkan untuk percobaan ini berupa daun yang sudah tua dan memenuhi persyaratan sebagai berikut: daun yang segar dan berwarna hijau tua umumnya lebih besar dan lebih tebal dipetik dengan kriteria dari pucuk pada urutan 3-5 (Abadi *et al.*, 2021).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas pada penelitian ini adalah perbedaan proses ekstraksi yaitu metode ekstraksi maserasi dan metode ekstraksi *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE).

2. Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai IC_{50} masing-masing ekstrak.
3. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah lokasi tumbuh simplisia, waktu panen, waktu proses pengeringan, waktu dan suhu proses ekstraksi.

E. Definisi Operasional

1. Simplisia Daun Nangka

Simplisia daun nangka memiliki aktivitas antioksidan karena mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, dan tannin.

2. DPPH

DPPH menggunakan senyawa antioksidan dari ekstrak simplisia daun nangka untuk mengatasi radikal bebas dengan cara meredamnya.

3. Inhibitory Concentration 50 (IC_{50})

Konsentrasi hasil sampel daun nangka yang dapat meredam suatu radikal bebas DPPH sebanyak 50%.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis), timbangan analitik (Ohaus PX224/E), sonikator (GT sonic), magnetic stirrer, hot plate (IKA C-Mag HS 7), bejana, grinder (Fomac), micropipet, propipet, pipet tetes, pipet ukur (Iwaki), tabung reaksi (Iwaki), toples kaca, rak tabung reaksi, batang pengaduk, gelas beker (Iwaki), erlenmeyer (Iwaki), labu takar (Iwaki), Oven (Mettler UN-55), wajan, kompor listrik.

2. Bahan

Ammonia (teknis), daun nangka, DPPH (himedia), etanol 70%(teknis), n-butanol (smart lab), asam asetat glasial (p.a), aquades (p.a), HCl, kuersetin (p.a), etanol (p.a), plat KLT *silica gel* F₂₅₄, FeCl₃ 10% (reagen), mayer (reagen), wagner (reagen), dragendorff (reagen), dan serbuk magnesium.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan sampel simplisia daun nangka

Daun nangka ini diambil dari kebun salah satu warga di Desa Karangawen, Kecamatan Girisubo, Kabupaten Gunungkidul, Yogyakarta pada koordinat 8°09'08.5"S 110°44'48.1"E. Waktu panen adalah pukul 06.30 pagi dengan kriteria daun berwarna hijau urutan 3-5 dari pucuk (Abadi *et al.*, 2021).

2. Determinasi Sampel Simplisia Daun Nangka

Determinasi tanaman daun nangka dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan. Determinasi daun nangka menggunakan daun, ranting dan buah dengan tujuan untuk memastikan morfologi tanaman agar tidak ada kesalahan dalam pengambilan sampel daun nangka yang digunakan untuk penelitian (Istiqomah *et al.*, 2021).

3. Pembuatan Ekstrak dan Kontrol Kualitas ekstrak

a. Proses Pembuatan Ekstrak

Daun nangka yang sudah dipanen dilakukan sortasi basah yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran pada daun nangka. Lalu setelah itu dicuci, dan ditiriskan kemudian dilakukan sortasi kering. Kemudian daun nangka dikeringkan pada suhu 40°C dengan kriteria daun hancur ketika diremas. Setelah itu, digrinder dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh (Istiqomah *et al.*, 2021). Proses ekstraksi dilakukan menggunakan 2 metode yaitu maserasi dan *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE).

1) Pembuatan ekstrak dengan metode UAE

Sebanyak 100 gram sampel diekstraksi dengan pelarut etanol 70% pada perbandingan 1:10 menggunakan sonikator pada suhu 40°C selama 30 menit. Setelah itu, disaring menggunakan kain saring terlebih dahulu kemudian menggunakan kertas saring lalu filtrat yang didapatkan dikentalkan menggunakan penangas air untuk melakukan proses penguapan (Ghani, 2022). Selanjutnya, nilai rendemen

dihitung dengan cara menimbang ekstrak kental.

2) Pembuatan ekstrak dengan metode maserasi

Sebanyak 100 gram sampel diekstraksi dengan metode maserasi pada perbandingan 1:10 menggunakan pelarut etanol 70% dan diekstraksi selama 30 menit dengan *magnetic stirrer* di atas *hotplate* pada suhu 40°C. Filtrat yang didapat disaring menggunakan kain saring terlebih dahulu kemudian menggunakan kertas saring lalu diuapkan menggunakan penangas air (Ghani, 2022). Setelah proses ekstraksi, ekstrak ditimbang dan dihitung nilai rendemennya pada persamaan (1).

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

b. Kontrol kualitas ekstrak

1) Uji organoleptis

Proses uji organoleptis menggunakan panca indera manusia secara kualitatif untuk mengevaluasi sifat fisik pada sampel simplisia daun nangka yang meliputi warna, bau, dan rasa.

2) Uji fitokimia

Dalam analisis fitokimia ini, uji yang dilakukan, berupa analisis alkaloid, flavonoid, fenolik dan tanin.

a) Alkaloid

Sebanyak 0,1 gram sampel ekstrak daun nangka dilarutkan 10 ml etanol 70% dan dicampurkan 5 tetes HCl 1%. Setelah itu, ekstrak dibagi menjadi 3 tabung reaksi. Ekstrak dicampurkan 1 mL masing-masing dengan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Positif alkaloid ditandai terbentuknya endapan jingga pada pereaksi Dragendorff, endapan putih pada pereaksi Mayer, dan endapan coklat pada pereaksi Wagner. Jika 2 pereaksi positif maka dapat dikatakan bahwa ekstrak tersebut positif

adanya kandungan alkaloid (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

b) Flavonoid

Sebanyak 0,1 gram sampel ekstrak daun nangka dicampurkan 0,1 gram magnesium dan ditetesi sebanyak 5 tetes asam klorida pekat, kemudian gojog. Bila terjadi perubahan pada larutan menjadi warna merah, kuning atau jingga, bisa disimpulkan ekstrak tersebut positif adanya kandungan flavonoid (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

c) Fenolik

Sebanyak 0,1 gram sampel ekstrak daun nangka dicampurkan dengan 5 tetes etanol 70%, lalu ditambahkan 3 tetes FeCl_3 5% diaduk hingga merata. Bila pada ekstrak terbentuk warna hijau, ungu, biru kehitaman, atau hijau kehitaman dapat dikatakan ekstrak tersebut positif adanya kandungan fenolik (Shumah, 2019).

d) Tanin

Sebanyak 0,1 gram sampel ekstrak daun nangka dicampurkan 5 ml akuades kemudian dipanaskan, lalu ditambahkan 3 ml FeCl_3 1% ke dalam ekstrak setelah dingin. Bila pada ekstrak membentuk hitam kehijauan, bisa disimpulkan ekstrak positif adanya kandungan tanin (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

3) Uji kadar air

Ditimbang ekstrak 1 gram masukkan dalam alat *moisturizer balance* dan diratakan. Suhu diatur 105°C dan ditunggu selama 30 menit. Setelah itu, dijalankan alat dan diperoleh data kadar air ekstrak daun nangka dengan syarat kadar air $<10\%$ (Agasta *et al.*, 2022).

4) Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis proses pertama membuat fase gerak dengan total 10 ml menggunakan n-butanol : asam asetat glasial : aquades (6:2:2) dan menggunakan

standar kuersetin 5 mg dilarutkan dalam etanol p.a 10 ml sedangkan pada sampel 10 mg ekstrak daun nangka metode UAE dan maserasi dilarutkan dalam 10 ml etanol p.a. Setelah itu menjenuhkan fase gerak dengan memasukkan kertas saring. Setelah fase gerak jenuh kemudian fase diam yaitu plat KLT *silica gel* F₂₅₄ diaktifkan dengan oven selama 10 menit dengan suhu 105°C. Setelah plat KLT aktif dilakukan penotolon sebanyak 5 totolan kemudian dimasukkan plat KLT ke dalam bejana yang telah terisi fase gerak yang sudah jenuh. Plat KLT diangkat dari dalam bejana. Plat KLT dikeringkan dan dilihat dengan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Nilai RF masing-masing sampel dan standar kuersetin dapat dianalisa menggunakan persamaan (2) (Saputri 2020).

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh solute}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}} \dots\dots\dots(2)$$

4. Uji aktivitas penangkapan radikal bebas ekstrak daun nangka terhadap DPPH
 - a. Pembuatan larutan DPPH (0,1 mM)

Serbuk DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) 3,94 mg dan dicampurkan etanol p.a pada labu takar 100 mL (Umboro & Yanti, 2020).

- b. Pembuatan larutan pembanding kuersetin

Membuat larutan induk kuersetin (100 ppm), menimbang 10 mg standar kuersetin dan ad 100 mL etanol p.a. Selanjutnya, dibuat konsentrasi uji 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm (Agasta *et al.*, 2022).

- c. Penentuan λ maksimal DPPH

Penentuan λ maksimum DPPH dengan 3 mL larutan DPPH lalu discanning menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan λ 400-800 nm (Agasta *et al.*, 2022).

- d. Penentuan *operating time*

Menemukan waktu reaksi yang ideal antara larutan uji yang mengandung DPPH dan pembanding standar adalah tujuan dari *operating*

time. Penentuan *operating time* ditentukan atas dasar dimulainya nilai absorpsi yang stabil pada waktu tertentu hingga berakhirnya absorpsi yang stabil tersebut. Proses menentukan *operating time* (OT) yaitu dilakukan dengan 2 mL DPPH pada konsentrasi 0,1 mM dicampurkan 6 ppm kuersetin sebanyak 1 mL. Setelah itu dilakukan pengukuran absorpsi setiap 60 menit (Rizki *et al.*, 2022).

- e. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Metode Maserasi Dan *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE)

Larutan induk ekstrak daun nangka metode maserasi dan *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE) dibuat masing-masing 100 ppm, dengan menimbang 10 mg ekstrak dan ad 100 mL etanol p.a. Selanjutnya dibuat konsentrasi uji 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm (Agasta *et al.*, 2022).

- f. Aktivitas Antioksidan (Metode DPPH)

Konsentrasi masing-masing larutan uji serta larutan pembanding dimasukkan sebanyak 1 mL pada tabung reaksi. Tambahkan 2 mL DPPH, kemudian diinkubasi di tempat yang terhindar dari cahaya selama *operating time* (OT). Absorpsi diukur menggunakan spektrotometer UV Vis pada λ maximum yang telah didapat (Umboro & Yanti, 2020).

H. Metode Analisis dan Pengolahan Data

1. Analisis Data Penentuan Nilai IC₅₀

Nilai absorpsi akan digunakan pada perhitungan persentase penghambatan menggunakan persamaan (3).

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

Keterangan:

A blanko : Absorpsi blanko

A sampel : Absorpsi sampel

Nilai IC₅₀ kemudian ditentukan menggunakan persamaan regresi linier. Dari berbagai larutan konsentrasi yang sudah dilakukan, dihitung nilai IC₅₀

menurut persentase penghambatan terhadap radikal DPPH.

Nilai IC_{50} dihitung menggunakan rumus:

$$y = bx + a$$

Keterangan:

y : 50

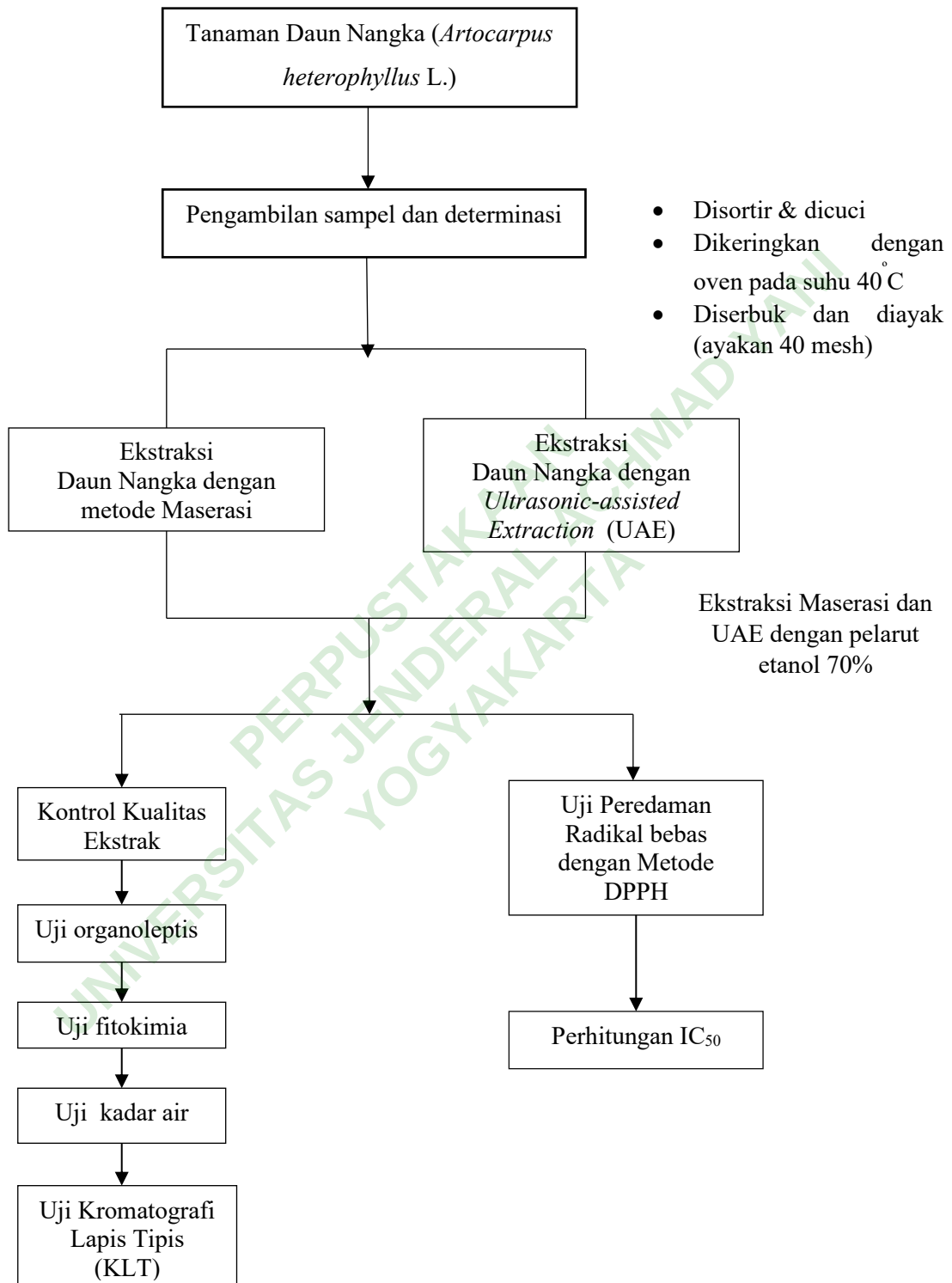
a : Titik perpotongan antara suatu garis dan sumbu Y pada diagram (*Intercept*) diperoleh dari regresi linier

b : Kemiringan (*slope*) diperoleh dari regresi linier

x : Hasil IC_{50}

2. Analisis Data Statistik

Menggunakan program *Statistical Analysis Software* (SPSS), berupa uji homogenitas dan normalitas. Nilai IC_{50} kuersetin dan ekstrak daun nangka yang diperoleh menggunakan metode DPPH diuji normalitas dengan metode *Shapiro Wilk*, untuk sampel ≤ 50 . Hasil uji homogenitas menggunakan metode *Levene test* untuk mengetahui varian data dalam penelitian ini. Uji statistik *T-Test independent* dapat digunakan pada data terdistribusi secara normal dan homogen. Selain itu, uji non-parametrik seperti uji *Mann-Whitney* dilakukan jika data yang didapat tidak normal dan homogen. Uji statistik *T-Test independent* dipilih untuk membandingkan pengaruh 2 metode ekstraksi terhadap nilai IC_{50} ekstrak daun nangka.



Gambar 7. Skema Pelaksanaan Penelitian