

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini melakukan pengujian eksperimental di laboratorium Prodi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Pengujian eksperimental ini menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) untuk analisis aktivitas peredaman radikal bebas pada daun kupu-kupu dengan variasi pelarut yaitu metanol, etanol 96% dan etanol 70%.

B. Lokasi dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni-Juli di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Prodi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

C. Populasi dan Sampel Daun Kupu-Kupu

1. Populasi

Sampel Daun kupu-kupu dipanen sebanyak mungkin sehingga menghasilkan 300 g serbuk daun kupu-kupu.

2. Sampel

Sampel yang akan dipakai yaitu bagian daun dari tanaman daun kupu-kupu. Kriteria Daun yang akan dipakai adalah daun muda dengan warna hijau muda (berada antara 2 sampai 4 bagian atas tanaman) dan berukuran sama kurang lebih 5 hingga 7 cm).

D. Variabel Penelitian

1. Variable utama

a. Variabel bebas

Variasi pelarut metanol dan etanol pada metode ekstraksi maserasi.

b. Variabel terikat

Nilai IC_{50} sebagai nilai aktivitas antioksidan sampel ekstrak daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.)

2. Variabel pengacau

a. Variable terkendali

Variable terkendali dalam penelitian ini, yaitu waktu panen, berat daun yang akan dihasilkan, dan tempat tumbuh tanaman.

b. Variabel tak terkendali

Variabel tak terkendali dalam penelitian ini, yaitu temperatur (kelembapan suhu) serta cuaca lingkungan.

E. Definisi Operasional

1. Aktivitas antioksidan

Kemampuan suatu pelarut metanol dan etanol sampel daun kupu-kupu untuk mengikat senyawa zat asing (radikal bebas).

2. *Inhibitory Concentration* 50 (IC_{50})

Hasil sampel ekstrak daun kupu-kupu yang mampu mengikat 50% zat asing DPPH.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Ayakan mesh 40, grinder simplisia (*fomac*), kertas saring *Whatman* no 1, oven (*memmert UN160*), toples besar, hot plate, *Waterbath* (*memmert*), seperangkat alat gelas (*Iwaki*), mikropipet 100-1000 μ l (*dlab*), spektrofotometer UV-Vis (*Thermo Scientific Genesis 10S*), thermometer, kompor listrik, panci, wajan, timbangan analitik (*Ohaus PX224/E*) dan *moisture balance* (*Ohaus MB-120*).

2. Bahan

Akuades (teknis), daun kupu-kupu, kuersetin, metanol, etanol 70% (teknis), etanol 96% (teknis), metanol (pro analisis), HCl pekat (pro analisis),

HCl 1N (teknis), pereaksi FeCl_3 5% (reagen), serbuk magnesium, pereaksi dreagendroff (reagen), pereaksi mayer (reagen), pereaksi wagner (reagen), DPPH (pro analisis).

G. Metode Pengumpulan Data

1. Persiapan Simplisia

Sampel Daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) diambil langsung di Desa Ngawu, Kecamatan Playen, Kabupaten Gunung Kidul. Daun kupu-kupu dipetik dengan kriteria daun hijau muda (urutan kedua sampai keempat dari pucuk tanaman) dipanen pada bulan Maret kemudian disortasi basah dan dicuci dengan air bersih untuk memastikan sampel dalam kondisi bersih dan terhindar dari kontaminan. Selanjutnya dilakukan perajangan untuk memudahkan proses pengeringan. Proses pengeringan dilakukan pada suhu 40°C sampai sampel kering yang ditandai dengan sampel yang rapuh dan mudah hancur. Selanjutnya sampel dijadikan serbuk dengan cara digrinder dan diayak dengan ukuran 40 mesh (Soegihardjo, 2013). Setelah itu serbuk sampel dimasukkan ke dalam wadah bersih dan ditimbang berat serbuk yang didapatkan dan dilanjutkan ke tahap berikutnya.

2. Pembuatan Ekstrak Sampel

Serbuk simplisia daun kupu-kupu sebanyak ± 100 gram dimaserasi menggunakan pelarut metanol dan etanol (1:10) dilakukan pengadukan selama 1 menit tiap 6 jam sekali selama 3 hari kemudian dilakukan disaring dengan kain mori. Filtrat yang telah didapatkan kemudian diuapkan pada suhu 40°C dengan *waterbath* hingga menghasilkan ekstrak kental. Dilakukan remaserasi pada masing-masing pelarut sebanyak 3 kali. Ekstrak kental yang telah diperoleh dilakukan penimbangan dan dihitung jumlah persentasi rendemen yang dihasilkan terhadap bobot serbuk simplisia. Kemudian dilakukan perhitungan nilai rendemennya (Cahya & Prabowo, 2019).

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

3. Uji Organoleptis

Proses pengujian organoleptis melibatkan penggunaan indera manusia untuk mengevaluasi sifat fisik sampel berupa warna dan aroma/bau, kemudian hasilnya dideskripsikan secara kualitatif.

4. Uji Penapisan Fitokimia

Dalam analisis fitokimia dilakukan dengan beberapa uji seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan fenolik (Purwasari *et al.*, 2017).

a. Alkaloid

Diambil 10 mg sampel ekstrak daun kupu-kupu dan ditambahkan secukupnya HCl 2N pada masing-masing tabung reaksi dan diberikan 2 tetes pereaksi *dreagendroff*, 2 tetes pereaksi *wagner*, dan 2 tetes pereaksi *mayer*. Amati perubahan selama 30 menit, positif alkaloid apabila pada masing-masing tabung reaksi sampai terbentuk endapan coklat pada uji *Wagner*, endapan berwarna putih pada uji *Mayer*, dan endapan berwarna jingga atau merah pada uji *Dragendroff*.

b. Flavonoid

Diambil 10 mg sampel ekstrak daun kupu-kupu masukkan kedalam tabung reaksi dan dilarutkan menggunakan pelarut. Kemudian 3 tetes HCl pekat dan 1 mg serbuk magnesium ditambahkan ke dalam tabung reaksi, lalu sampel digojog dan amati hingga ada perubahan. Flavonoid dinyatakan positif dalam larutan berwarna merah, kuning, atau jingga.

c. Saponin

Diambil 10 mg sampel ekstrak daun kupu-kupu dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan air panas. Gojog tabung reaksi selama 10 detik, Hasil positif saponin ditandai jika selama 30 menit terjadi pembentukan buih/busa, dan apabila diberikan 3 tetes HCl 2 N busa tersebut tetap tidak hilang.

d. Tanin

Diambil 10 mg sampel ekstrak daun kupu-kupu masukan kedalam tabung reaksi. Dilarutkan dengan aquadest 0,5 ml kemudian di ambil 1 ml

larutan tersebut dan ditambahkan larutan FeCl_3 beberapa tetes. Amati perubahan, hasil positif tanin ditandai apabila terjadi pembentukan larutan berwarna biru tua atau hitam kehijauan.

e. Fenolik

Diambil 10 mg sampel masukan kedalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 2 ml etanol 70% dan dipanaskan. Diambil 1ml lalu ditetesi 3 tetes FeCl_3 5%. Amati perubahan, hasil positif fenolik ditandai apabila terjadi pembentukan larutan berwarna hijau atau hijau kebiruan

5. Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

Larutan DPPH 0,1 mM dibuat dengan cara 3,94 mg DPPH dilarutkan dengan metanol p.a ad 100 mL pada labu takar 100 ml digojog hingga tercampur merata. Disimpan larutan pada tempat tertutup yang terhindar dari cahaya (Purwasari *et al.*, 2017).

b. Pembuatan Larutan pembanding Kuersetin

Kuersetin sebanyak 1 mg dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL. lalu larutkan kuersetin dengan metanol lalu cukupkan volumenya dengan metanol hingga batas tanda sehingga larutan standar kuersetin yang diperoleh sebanyak 10 ppm. Kemudian larutan induk kuersetin 10 ppm dibuat seri konsentrasi (5 ml) pada konsentrasi 2,4,6,8 dan 10 ppm. Dengan cara diambil sebanyak 1 ml; 2 ml; 3 ml; 4 ml; 5 ml dari larutan induk kuersetin 10 ppm lalu dimasukkan pada masing-masing labu ukur 5 ml lalu tambahkan metanol p.a hingga batas tanda (Purwasari *et al.*, 2017)

c. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak daun kupu-kupu

Larutan baku dibuat 5000 ppm dengan cara 50 mg ekstrak kental ditimbang lalu larutkan dengan metanol p.a untuk sampel metanol dan etanol p.a untuk sampel etanol 96% dan etanol 70% ad 10 ml sambil digojog dan dihomogenkan. Larutan dibuat seri konsentrasi dalam 5 ml yakni 100, 300, 500, 700, dan 900 ppm (Purwasari *et al.*, 2017).

d. Penentuan λ Maksimal DPPH

Panjang gelombang maksimum pada DPPH digunakan untuk mengetahui pada panjang gelombang berapa DPPH memberikan serapan maksimum. Panjang ditentukan dengan cara larutan DPPH 0,1 mM dimasukkan dalam kuvet dengan blanko yang digunakan metanol p.a. Diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan λ 400-800 nm. Dilakukan *scanning* hingga diperoleh λ DPPH optimum.

e. Penentuan *Operating Time*

Operating time adalah waktu optimal untuk bereaksi antara larutan uji dan baku pembanding dengan DPPH yang diberikan. Proses penentuan *operating time* dilakukan dengan Langkah berikut: Dimasukkan larutan DPPH 0,1 mM pada masing-masing tabung reaksi sebanyak 2 ml. Kemudian tambahkan larutan kuersetin 1 mL dengan konsentrasi 6 ppm dan menggunakan blanko metanol p.a. selama 45 menit Kemudian *Operating Time* dibaca pada panjang gelombang maksimal yang didapat (Pramiastuti *et al.*, 2021). Selanjutnya diamati waktu optimal yang didapat dari nilai absorbansi yang stabil.

f. Penentuan Aktivitas Antioksidan (Metode DPPH)

Diambil 1 mL pada tiap seri kadar konsentrasi larutan uji ekstrak sampel dan larutan pembanding kuersetin dimasukkan pada tiap tabung reaksi setelah itu diberikan 2 mL larutan DPPH. Campuran dari tiap larutan seri konsentrasi dihomogenkan dan dibiarkan pada tempat yang gelap dalam suhu ruang selama 38 menit tersebut diperoleh dan dibaca pada λ max yang diperoleh. Aktivitas antioksidan ditentukan dengan cara menghitung persentase inhibisi serapan DPPH (Risasti & Oktiansyah, 2023)

g. Penentuan IC_{50} (*Inhibitory Concentration*)

Nilai IC_{50} biasa dinyatakan sebagai % *Inhibisi* dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol DPPH} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

Perhitungan dilakukan menggunakan persamaan regresi linear, $y = bx + a$, setelah diperoleh (% inhibisi) dari setiap konsentrasi.

Keterangan:

y: persen inhibisi (%)

x: konsentrasi

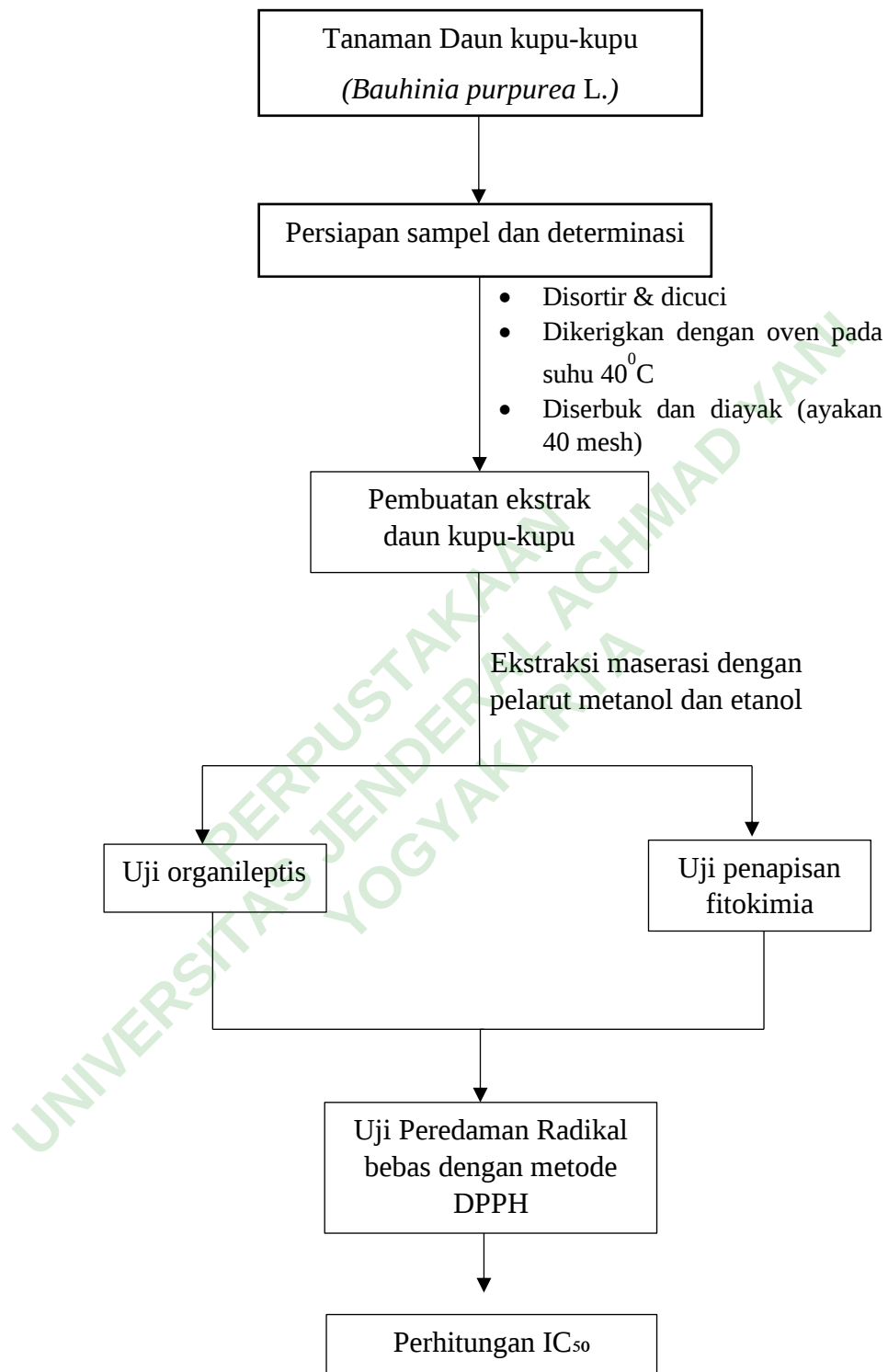
a: *Intercept* (perpotongan garis di sumbu y)

b: Kemiringan (*slope*)

H. Metode Analisis dan Pengolahan Data

1. Uji Analisis Data Statistik

Penelitian ini data IC_{50} yang didapat dari variasi pelarut dianalisis uji statistik menggunakan software *SPSS*. Penelitian ini uji *Shapiro-Wilk* untuk menentukan uji normalitas, karena untuk sampel dengan jumlahnya yang kecil. Uji homogenitas menggunakan uji *Levene's* untuk mengetahui varians data dalam penelitian ini. Selanjutnya, dilakukan uji ANOVA satu arah (*One Way Anova*) kemudian dilanjutkan uji Post-hoc Tukey HSD terdapat perbedaan signifikan yaitu jika $p \leq 0.05$.



Gambar 8. Skema Penelitian