

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Dilakukan penelitian dengan metode desain eksperimental. Daun mangga arumanis (*Mangifera indica* L. var. *Arumanis*) diekstraksi dengan 2 metode yaitu maserasi dan soxhletasi. Kemudian hasil dari kedua ekstrak diuji akativitas peredaman radikal bebas secara kuantitatif memakai metode DPPH. Uji kuantitatif antioksidan digunakan untuk mengetahui aktivitas peredaman radikal bebas.

B. Lokasi dan Waktu

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini bertempat di Laboratorium Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juli 2024.

C. Sampel dan Populasi

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini yakni daun mangga arumanis (*Mangifera indica* L. var. *Arumanis*) yang diambil di daerah Brajan, Tamantirto, Kasihan, Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta (titik koordinat: -7.818573,110.330915).

2. Sampel

Sampel daun mangga Arumanis dipetik dari daun ke tujuh sampai habis, dan berwarna hijau tua (Kardiansyah & Endrawati, 2023).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi yang berbeda, yakni metode maserasi dan metode soxhletasi.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat yang akan diukur adalah nilai aktivitas antioksidan berupa nilai IC_{50} dalam sampel.

3. Variabel Terkendali

Variabel yang dikendalikan pada penelitian ini adalah asal tanaman, konsentrasi sampel uji, bagian daun, pelarut, suhu pengeringan, suhu pengeringan dan waktu pengeringan.

E. Definisi Operasional

1. Kandungan daun mangga

Daun mangga memiliki aktivitas antioksidan karena mengandung fenolik, flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, monoterpen, dan steroid.

2. Peredaman radikal bebas

Penetapan peredaman radikal bebas pada ekstrak dilakukan melalui metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*), memakai spektrofotometer UV-Vis pada (λ maks). Kuersetin digunakan sebagai standar pembanding dengan nilai IC_{50} sebagai parameter penentunya.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Beberapa alat yang akan digunakan meliputi: ayakan 40 mesh, alat soxhletasi, botol ekstrak, grinder, bejana maserasi (toples), corong pisah (*Pyrex*), cawan porselin, gelas ukur 50 ml dan 100 ml (*Pyrex*), gelas beaker 100 ml (*Pyrex*), kompor listrik, kaca arloji, lemari asam, labu ukur 50 ml (*Pyrex*), *moisture balance (ohaus MB-120)*, magnetic stirrer, mikropipet (*Eppendorf*), neraca analitik (*Ohaus Pioneer*), oven (*Memmert UN160*), mikropipet eppendorf (100-1000 μ l), pipet ukur 10 ml (*pyrex*), pipet tetes, rak tabung reaksi, spektrofotometer UV-Vis (Term Scientific Genesys 10S UV-VIS), sendok spatula, tabung reaksi, statif klem dan *waterbath (Memmert)*.

2. Bahan

Sampel daun mangga arumanis, asam asetat glasial, DPPH (1,1-*diphenyl-2-picrylhydrazyl*) (*p.a*), Etanol 70% (teknis), FeCl₃ (*p.a*), HCl pekat (*p.a*), n-Heksana (*p.a*), HCl 2N (*p.a*), H₂SO₄ (*p.a*), Kuersetin (*p.a*), n-Butanol (*pa*), Pereaksi mayer (reagen), Serbuk magnesium, Metanol (*p.a*) dan Gelatin 1% (teknis).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan sampel dan determinasi tanaman

Sampel penelitian diperoleh dari pekarangan warga yang terletak di Dusun Brajan, Tamantirto, Kasihan, Bantul, yang berada di Daerah Istimewa Yogyakarta. Proses pengambilan sampel dilakukan dengan memetik daun dari pohon tersebut, dimulai dari daun yang ketujuh hingga pangkal daun, dengan memastikan bahwa warna daun yang diambil adalah berwarna hijau tua (Kardiansyah & Endrawati, 2023). Setelah pengambilan sampel, uji determinasi dilaksanakan di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta, yang berada di kampus 4. Uji determinasi ini bertujuan untuk memastikan bahwa identifikasi tanaman yang akan diteliti dilakukan dengan akurat, sehingga dapat menghindari kemungkinan kesalahan dalam proses pengumpulan bahan dan mencegah terjadinya pencampuran antara tanaman yang sedang diteliti dengan tanaman lain yang mungkin mirip.

2. Persiapan sampel

Sampel daun mangga Arumanis dipetik dari daun ke tujuh hingga pangkal daun, warna daun hijau tua (Kardiansyah & Endrawati, 2023) dipetik pada saat pagi hari pukul 05.00 WIB untuk terhindar dari fotosintesis sehingga metabolit sekunder yang didapat lebih tinggi (Sosilowati & Sari, 2020). Dicuci daun sebanyak 4 kg memakai air mengalir hingga bersih untuk menghilangkan kotoran yang melekat, dikering anginkan, lalu keringkan memakai oven dengan suhu 50°C hingga kering. Selanjutnya, sampel dihancurkan menjadi serbuk memakai grinder dan diayak memakai ayakan 40 mesh. Perlakuan ini

dilakukan untuk meningkatkan kontak dengan pelarut dan mengecilkan ukuran partikel.

3. Ekstraksi

Ekstrak daun mangga kemudian dibagi menjadi 2 bagian untuk dilakukan proses ekstraksi yaitu maserasi dan soxhletasi.

a. Maserasi

Serbuk daun mangga ditimbang 200 gram kemudian dimasukkan dalam sebuah bejana untuk direndam dengan pelarut etanol 70% sebanyak 2 liter (1:10). Kemudian serbuk diaduk, ditutup rapat, dan didiamkan pada tempat gelap. Penyimpanan di tempat gelap serta terlindung dari sinar matahari untuk mencegah interaksi sampel dengan cahaya, yang dapat menyebabkan degradasi senyawa antosianin. Diaduk setiap 8 jam selama tiga hari berturut-turut untuk memastikan serbuk kontak dengan pelarut secara menyeluruh dan mempercepat waktu pelarut mengekstraksi sampel sehingga zat aktif dapat larut dengan baik. Proses penyaringan filtrat dilakukan untuk memisahkan dari maserat memakai kertas saring, Kemudian remaserasi dilakukan dalam waktu 24 jam dengan pelarut pada perbandingan yang sama (Kurniawati *et al.*, 2021). Filtrat yang dihasilkan selanjutnya diuapkan dengan penangas air pada suhu 45°C dan hasilnya berupa ekstrak kental daun mangga arumanis.

b. Soxhletasi

Diambil serbuk daun mangga arumanis, kemudian ditimbang sebanyak 20g dan dimasukkan kedalam kedalam thimble (selongsong kertas saring), lalu dimasukkan pada soxhlet. Langkah berikutnya adalah menuangkan 200 ml etanol 70% (1:10) yang dialiri melalui sampel ke dalam labu alas bulat dan diekstraksi hingga cairan pelarut yang menetes di atas bahan selama 6 siklus sehingga menjadi lebih jernih. *Heating mantle* dinyalakan pada suhu 70°C selama 7 jam dengan dilakukan 2 kali ekstraksi. Ekstrak yang diperoleh akan berbentuk cair (Darnengsih *et al.*, 2018). Filtrat yang dihasilkan selanjutnya diuapkan dengan penangas air pada suhu 45°C dan hasilnya berupa ekstrak kental mangga arumanis.

4. Kadar air

Ekstrak dari setiap ekstraksi ditimbang 0,5 gram dalam cawan alumunium dan ditempatkan secara merata di seluruh sisi cawan. Kemudian, suhu alat diatur menjadi 105°C, sehingga nilai kadar air yang keluar dari alat dapat diperoleh setelah pengujian selesai. Memenuhi syarat jika kadar airnya kurang dari 10%. Pengukuran kadar kelembaban memakai alat *moisture balance* (Sumantining *et al.*, 2022).

5. Kontrol kualitas ekstrak daun mangga

a. Nilai rendemen

Perhitungan rendemen ekstrak etanol menggunakan metode maserasi dan soxhletasi dilakukan dengan rumus:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat serbuk simplisia}} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

b. Uji organoleptik

Uji organoleptik bertujuan untuk mengetahui secara objektif terhadap ekstrak yang diperoleh dengan menguji tekstur, bau, dan warna.

c. Skrining fitokimia

2) Uji alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun mangga dilarutkan dalam 5 mL etanol, kemudian ditambahkan 5 mL larutan HCl dengan konsentrasi 2N.

- a) Pereaksi Mayer: Ambil 2,5 mL larutan dan tambahkan reagen Mayer. Positif mengandung alkaloid, akan terbentuk endapan putih atau kekuningan.
- b) Pereaksi Dragendorff: Ambil 2,5 mL larutan dan tambahkan reagen Dragendorff. Positif mengandung alkaloid, akan terbentuk endapan coklat hingga kuning atau jingga.
- c) Pereaksi Wagner: Ambil 2,5 mL larutan dan tambahkan reagen Wagner. Positif mengandung alkaloid, akan terbentuk endapan coklat (Aiyuba *et al.*, 2023).

Jika dua dari tiga uji yang dilakukan menunjukkan hasil positif, maka dapat disimpulkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid.

3) Uji saponin

Setiap ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram, kemudian dilarutkan dalam 10 mL akuades dan diaduk secara intens selama 1 menit. Setelah proses pengadukan, campuran tersebut dibiarkan selama 10 menit untuk mengamati adanya buih atau busa. Selanjutnya, 2 mL larutan HCl 2 N ditambahkan untuk melakukan konfirmasi. Jika hasilnya menunjukkan buih yang tetap, maka dapat disimpulkan bahwa sampel tersebut mengandung saponin (Aiyuba *et al.*, 2023).

4) Uji flavonoid

Setiap ekstrak yang diperoleh ditimbang seberat 0,1 gram dan kemudian dilarutkan dalam 5 mL etanol dengan kemurnian *p.a.* Larutan yang terbentuk selanjutnya dipanaskan dalam tabung reaksi selama 5 menit untuk memastikan pelarutan yang optimal. Setelah proses pemanasan selesai, larutan tersebut dicampur dengan 10 tetes larutan HCl pekat dan ditambahkan 0,2 gram serbuk magnesium. Keberadaan senyawa flavonoid dalam larutan dapat diidentifikasi melalui perubahan warna yang terjadi, di mana larutan akan menunjukkan perubahan warna menjadi merah, kuning, atau jingga jika senyawa flavonoid memang terdapat di dalamnya (Aiyuba *et al.*, 2023).

5) Uji tannin

Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditimbang dan kemudian dilarutkan dalam etanol (*p.a.*). Setelah itu, 0,5 gram ekstrak yang telah dilarutkan dicampur dengan 5 mL larutan gelatin 1% (dengan 1 gram gelatin dalam 100 mL larutan NaCl). Positif adanya senyawa tanin dapat diindikasikan dengan terbentuknya endapan putih kekuningan pada campuran tersebut (Aiyuba *et al.*, 2023).

6) Uji steroid/Terpenoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam 5 mL etanol (*p.a*). Selanjutnya, ditambahkan 3 tetes pereaksi Liebermann-Burchard yang terdiri dari asam asetat glasial dan H₂SO₄ pekat. Campuran tersebut diaduk dan dibiarkan selama 10 menit. Kehadiran senyawa triterpenoid akan ditunjukkan oleh perubahan warna larutan menjadi merah atau ungu, sedangkan adanya senyawa steroid akan terlihat dari perubahan warna larutan menjadi biru atau hijau (Aiyuba *et al.*, 2023)

6. Identifikasi senyawa flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Pembuatan fase gerak dan penjenjuran bejana

Fase gerak akan dipersiapkan dengan menggabungkan pelarut n-Butanol, asam asetat glasial, dan air dalam rasio 4:1:5. Campuran pelarut ini kemudian ditempatkan dalam sebuah chamber, yang kemudian ditutup rapat, dan dilakukan proses penjenjuran memakai kertas saring. Proses ini mempunyai tujuan untuk memastikan bahwa fase gerak benar-benar jenuh sebelum melanjutkan proses kromatografi (Puspita Astuti *et al.*, 2022).

b. Pembuatan larutan ekstrak dan pembanding kuersetin

Ekstrak etanol yang diperoleh dari proses ekstraksi maserasi dan soxhletasi masing-masing disiapkan dengan melarutkan 5 mg ekstrak dalam 50 mL etanol (*p.a*), sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Selanjutnya, sebanyak 5 mg kuersetin ditimbang dan dilarutkan dalam etanol (*p.a*) hingga volume larutan mencapai 50 mL, yang juga menghasilkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm (Puspita Astuti *et al.*, 2022).

c. Prosedur KLT

Plat silika gel F₂₅₄ dengan ukuran lebar 4 cm dan tinggi 10 cm digunakan sebagai fase diam dalam penelitian. Plat ini telah dipersiapkan dengan memberikan garis pada bagian atas dan bawahnya, masing-masing sejauh 1 cm. Plat KLT dengan silika gel diaktivasi melalui pemanasan

selama 40 menit pada suhu 110°C. Pemanasan dilakukan untuk menghilangkan uap air yang mungkin masih terdapat pada plat KLT, sehingga selama proses elusi, plat KLT dapat menyerap eluen dengan lebih efektif. Setiap ekstrak dan standar kuersetin ditotolkan pada area yang ditandai di bagian bawah silika gel F₂₅₄ memakai white tip, dengan jarak antar totolan sekitar 1 cm. Setelah itu, plat KLT ditempatkan di dalam chamber untuk proses elusi hingga eluen mencapai batas yang ditandai di bagian atas plat silika gel. Selanjutnya, plat dikeringkan dan dilihat memakai sinar UV dengan panjang gelombang 254 dan 365 nm (Putri *et al.*, 2023).

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh analit}}{\text{jarak tempuh elusi}} \dots\dots\dots(4)$$

7. Uji peredaman radikal bebas

a. Pembuatan larutan DPPH (0,1 mM)

Sebanyak 3,94 mg serbuk DPPH dilarutkan dalam 100 mL etanol *p.a.* memakai labu takar 100 mL. Setelah proses pelarutan selesai, bagian luar labu ditutup dengan alumunium foil untuk melindungi larutan dari cahaya dan menghindari potensi pengaruh luar yang dapat mempengaruhi hasil pengujian (Pamungkas *et al.*, 2017).

b. Pembuatan larutan standar kuersetin

Sebanyak 100 mg kuersetin dilarutkan dalam 100 mL etanol *p.a.* untuk menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan ini, dibuatlah beberapa larutan dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, dan 8 ppm. Setiap larutan dengan konsentrasi tersebut disiapkan dalam 25 mL etanol *p.a.* (Bakti *et al.*, 2017).

c. Pengukuran absorbansi DPPH

Dipipet 3 mL larutan DPPH dimasukkan ke dalam kuvet. Kemudian serapan larutan DPPH diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Putri & Mahfur, 2023). Etanol *p.a.* digunakan sebagai blanko.

d. Pengukuran panjang gelombang maksimal

1 mL larutan kuersetin dengan konsentrasi 4 ppm dicampurkan dengan 2 mL larutan DPPH yang mempunyai konsentrasi 0,1 mM. Selanjutnya, untuk menentukan panjang gelombang maksimum yang optimal, absorbansi dari campuran tersebut diukur memakai spektrofotometer UV-Vis dalam rentang panjang gelombang antara 400 nm hingga 800 nm. Setelah pengukuran awal, dilakukan pemindaian (*scanning*) pada rentang tersebut untuk memperoleh panjang gelombang yang optimal, di mana absorbansi menunjukkan hasil yang paling optimal (Putri & Mahfur, 2023)

e. Penentuan *operating time*

1 mL larutan kuersetin dengan konsentrasi 4 ppm dicampurkan dengan 2 mL larutan DPPH dengan konsentrasi 0,1 mM. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan dengan digojog, dan absorbansinya diukur setiap menit selama 1 jam memakai panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan. Waktu dimana absorbansi DPPH stabil merupakan *operating time* (Putri & Mahfur, 2023).

f. Pembuatan larutan sampel ekstrak daun mangga arumanis

Sebanyak 25 mg dari setiap hasil ekstraksi, yang diperoleh melalui metode maserasi dan soxhletasi, diambil dan dilarutkan dalam 25 mL etanol *p.a.* untuk menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan 1000 ppm ini, dibuat serangkaian larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah, yaitu 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm. Setiap larutan dengan konsentrasi tersebut disiapkan dalam volume 25 mL etanol *p.a.*

g. Pengujian aktivitas peredaman aktivitas radikal bebas

Diambil 1 mL sampel atau standar pada masing masing seri konsentrasi. kemudian ditambah 2 ml DPPH lalu didiamkan selama OT yang didapat. Setelah itu dibaca absorbansinya sesuai panjang gelombang maksimum. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali (HD & Nasution, 2022).

8. Metode pengolahan data

Data absorbansi yang telah terkumpul akan digunakan untuk menganalisis aktivitas antioksidannya dengan menghitung persen inhibisi menggunakan rumus berikut.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100\% \dots \dots \dots (5)$$

Selanjutnya, data yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier dengan x sebagai konsentrasi (ppm) dan y sebagai persentase inhibisi (%). Dari perhitungan ini, didapatkan rumus $y = bx + a$, dan nilai IC_{50} dihitung berdasarkan rumus tersebut.

$$Y = bx + a \dots \dots \dots (6)$$

Keterangan:

Y = persentase inhibisi (%)

X = konsentrasi

A = *intercept* (perpotongan garis di sumbu y)

B = *slope* (kemiringan)

Kekuatan antioksidan ditentukan berdasarkan nilai IC_{50} dengan kategori seperti pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Kategori Aktivitas Antioksidan (Putri & Hidajati, 2015)

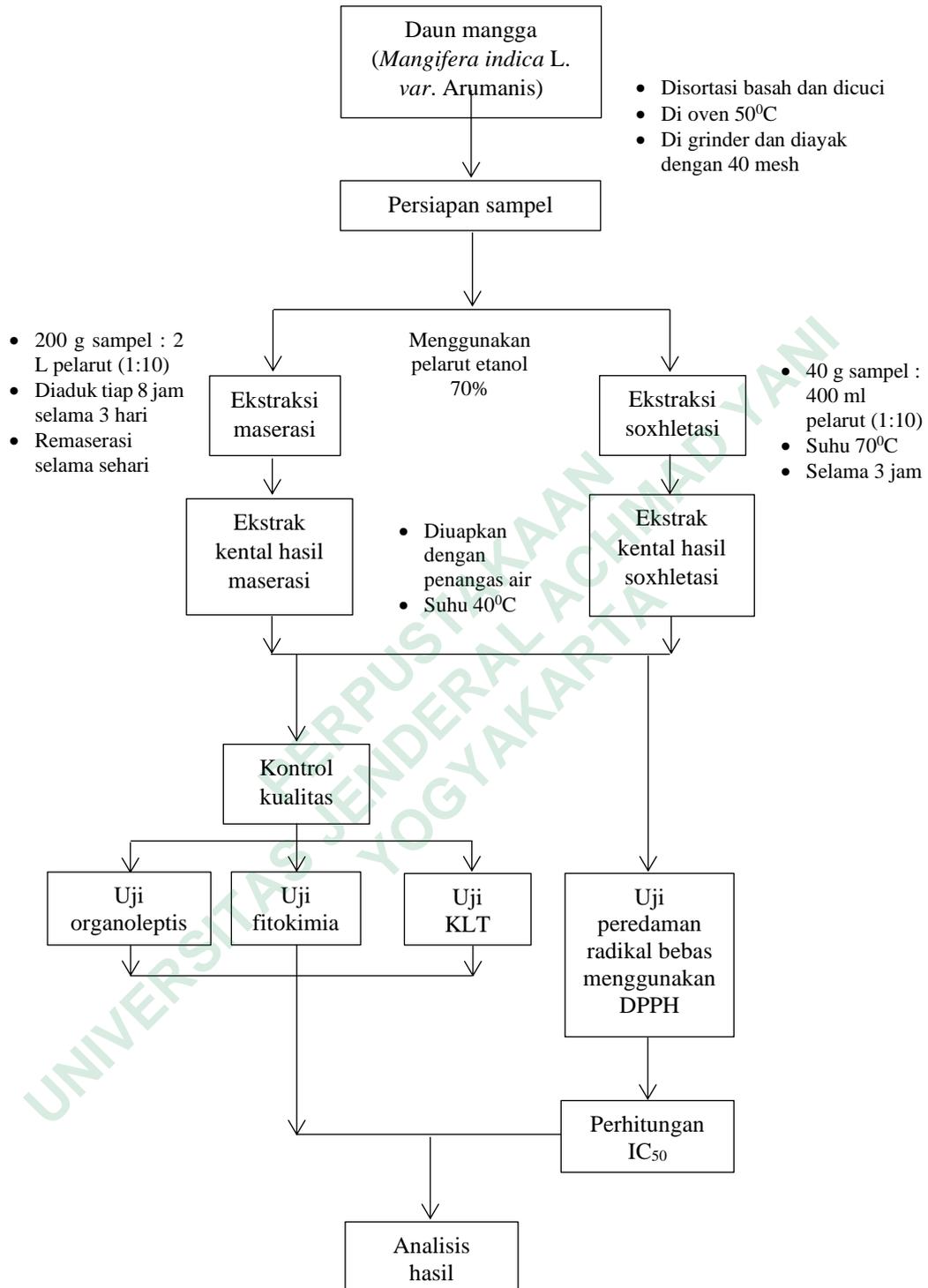
kategori antioksidan	Nilai IC_{50} (ppm)
Sangat kuat	<50
Kuat	50-100
Sedang	100-250
Lemah	250-500
Sangat lemah	>500

9. Uji statistik

Nilai IC_{50} dari metode maserasi dan soxhletasi yang didapatkan akan dianalisis secara statistik memakai SPSS. Sebelumnya, dilakukan uji Levene's atau uji homogenitas untuk menentukan apakah ada perbedaan variasi antara beberapa data dari populasi yang mempunyai varian sama atau tidak. Kemudian uji normalitas memakai *Shapiro-Wilk* untuk sampel dengan jumlah yang kecil (<50). Data dari kedua uji tersebut dapat dilihat kesignifikannya, yaitu $p > 0,05$ dan dilanjutkan dengan pengujian parametrik. Uji parametrik yang digunakan adalah uji T *independent*. Jika data yang diperoleh tidak

homogen atau tidak terdistribusi normal, maka digunakan uji non-parametrik, yaitu uji Mann-Whitney sebagai langkah alternatif untuk uji T *independent*. Hasil Uji T *independent* disebut signifikan memiliki perbedaan, jika memiliki $p < 0,05$. Hal ini bertujuan untuk memastikan apakah terdapat perbedaan dalam aktivitas peredaman radikal bebas antara kedua metode ekstraksi.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
PERPUSTAKAAN
YOGYAKARTA



Gambar 6. Skema Penelitian