

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis desain penelitian yang digunakan merupakan desain eksperimental dengan pendekatan kuantitatif yaitu menentukan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) ekstrak etanol bunga kamboja putih (*Plumeria alba* L.) menggunakan dua metode ekstraksi yaitu maserasi dan UAE.

B. Lokasi Dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi, Program Studi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian dilakukan sejak April – Juni tahun 2024.

C. Populasi/Sampel/Objek Penelitian

1. Populasi

Bunga Kamboja Putih dipetik dari halaman pura Jagatnata Banguntopo yang ada di Jomblangan, Kecamatan Banguntapan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta (titik kordinat -7.79422, 110.40176).

2. Sampel

Bunga yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga dengan kriteria berupa bunga muda yang sudah mekar, berwarna putih segar, dan permukaan bunga tidak berlubang akibat gigitan serangga.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi ekstrak bunga kamboja putih.
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai IC₅₀

3. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah, tempat tumbuh, suhu dan waktu yang digunakan dalam pembuatan ekstrak bunga kamboja putih.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak bunga kamboja putih merupakan ekstrak yang didapatkan dari proses maserasi dan UAE menggunakan pelarut etanol 70%.
2. Aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dinyatakan dalam IC_{50} (*inhibition concentration*) yang merupakan konsentrasi ekstrak bunga kamboja putih dalam menghambat 50% radikal bebas DPPH.

F. Alat Dan Bahan

1. Alat
Ayakan mesh 60, cawan porselin, grinder (Fomac), kompor listrik, labu ukur, mikropipet (Ohaus), *moisture analyzer* (Ohaus MB-120), pipet ukur, sonikator (GT-Sonic), spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 10S), timbangan analitik (Ohaus PAJ1003), toples kaca untuk maserasi, tabung reaksi, dan alat-alat gelas kaca lainnya (*Pyrex*).
2. Bahan
Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu bunga kamboja putih, $AlCl_3$ 10% (teknis), akuades (p.a), *blue tip*, DPPH (sigma aldrich), etanol 70% (teknis), etanol (p.a), etil asetat (p.a), HCl pekat (p.a), HCl 1N (p.a), kain mori, kertas saring, kuersetin (p.a), metanol (p.a), n-heksan (p.a), pereaksi $FeCl_3$ 10% (reagen), reagen Dragendroff (teknis), reagen Mayer (teknis), reagen Wagner (teknis), dan serbuk magnesium (p.a).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Bunga kamboja putih yang digunakan berasal dari halaman Pura Jagatnata Banguntopo di daerah Jomblangan, Kecamatan Banguntapan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Kemudian determinasi tanaman bunga kamboja putih dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan. Determinasi tanaman dilakukan untuk mencocokkan morfologi tanaman agar tidak terjadi kekeliruan dalam pengambilan sampel (Fikayuniar *et al.*, 2023).

2. Pengumpulan sampel

Bunga kamboja putih dipanen antara pukul 05.00 hingga 08.00 dengan total berat 3 kg, kemudian dipisahkan dari tangkainya dan dipilih bagian yang segar serta menghindari bagian yang layu. Proses selanjutnya adalah sortasi basah, di mana bunga kamboja putih dibersihkan menggunakan air mengalir bertujuan menyingkirkan kotoran yang berada pada bunga. Langkah ini bertujuan untuk memastikan bunga kamboja putih bersih dari segala jenis kontaminasi. Setelah dicuci, bunga kamboja putih dikeringkan dan dioven pada suhu 40°C selama 3 hari, dengan kriteria bunga yang hancur saat diremas. Simplisia kemudian digiling menggunakan grinder hingga menjadi serbuk halus dan diayak menggunakan ayakan berukuran 60 mesh, menghasilkan serbuk simplisia dengan ukuran seragam (Arianta *et al.*, 2022).

3. Pembuatan ekstrak etanol bunga kamboja putih

Metode ekstraksi yang digunakan untuk membuat ekstrak bunga kamboja putih yaitu maserasi dan UAE.

a. Maserasi

Sebanyak 100 g serbuk simplisia bunga kamboja diekstraksi dengan 1000 mL pelarut etanol 70% pada perbandingan 1:10. Sampel ditempatkan dalam bejana maserasi dan didiamkan selama 1 jam sambil diaduk setiap 30 menit selama 2 menit. Hasil maserasi disaring menggunakan kain mori untuk mendapatkan filtrat. Filtrat disaring kembali menggunakan kertas

saring guna bebas dari ampas yang tersisa. Ampas hasil penyaringan diremaserasi kembali menggunakan 500 mL pelarut etanol 70% dengan cara yang sama. Filtrat dari kedua proses ekstraksi digabungkan dan diuapkan dengan menggunakan penangas air pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.

b. UAE

Sebanyak 100 g serbuk bunga kamboja putih ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 1000 mL (1:10). Sampel dibagi kedalam dua labu erlenmeyer, masing-masing wadah terdiri dari 50 g serbuk dan 500 mL pelarut. Kemudian diekstraksi selama 1 jam menggunakan sonikator pada suhu 25°C, hasil ekstraksi disaring menggunakan kain mori untuk mendapatkan filtrat. Filtrat disaring kembali menggunakan kertas saring guna bebas dari ampas yang tersisa, ampas hasil penyaringan diekstraksi kembali menggunakan 500 mL pelarut etanol 70% dengan cara yang sama. Filtrat dari kedua proses ekstraksi digabungkan dan diuapkan dengan menggunakan penangas air pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental. (Suhendar *et al.*, 2020). Setelah didapatkan ekstrak kental bunga kamboja putih dari masing-masing ekstraksi, kemudian dihitung nilai rendemen menggunakan persamaan (1):

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

4. Penetapan kadar air

Ekstrak bunga kamboja putih dari masing-masing metode ekstraksi dimasukkan ke dalam cawan hingga mencapai berat 0,5 g. Setelah itu, cawan dengan ekstrak ditempatkan di *moisture analyzer* yang diatur pada suhu 105°C. Proses ini berlanjut sampai alat memberikan sinyal, dan hasil kadar airnya dapat langsung terlihat pada layar. Selanjutnya, hasil pengukuran kadar air tersebut dicatat (Cahyanigrum *et al.*, 2024)

5. Uji organoleptik

Pengujian organoleptik untuk mengetahui sifat fisik sampel yang meliputi warna, aroma dan tekstur, lalu hasilnya dideskripsikan secara kualitatif (Hidayat *et al.*, 2017).

6. Uji penapisan fitokimia

Pada analisis penapisan fitokimia ini, uji dilakukan pada ekstrak dari metode maserasi dan UAE. Analisis yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan fenolik (Arianta *et al.*, 2022).

a. Alkaloid

Sebanyak 1 g ekstrak diambil dan ditambahkan masing-masing 10 mL kloroform dan amonia. Campuran tersebut diaduk hingga merata lalu disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat. Setelah itu, 10 tetes H_2SO_4 2N ditambahkan ke dalam filtrat, lalu campuran digojog pelam-pelan dibiarkan selama beberapa menit hingga membentuk dua lapisan. Lapisan paling atas dipindahkandalam tiga tabung reaksi, masing-masing sebanyak 1 mL. Pada tabung A, beberapa tetes reagen Mayer ditambahkan; pada tabung B, reagen Wagner ditambahkan; dan pada tabung C, reagen Dragendorff ditambahkan. Prosedur ini bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa tertentu dalam ekstrak dengan menggunakan reagen yang berbeda. Hasil positif apabila dalam tabung A terdapat endapan putih atau kuning terbentuk setelah penambahan reagen Mayer, dalam tabung B terdapat endapan coklat terbentuk setelah penambahan reagen Wagner, dan dalam tabung C terdapat endapan jingga atau merah pada uji Dragendroff. Sampel dikatakan mengandung alkaloid apabila minimal didapat endapan pada dua atau lebih pereaksi pengendapan yang dilakukan (Arianta *et al.*, 2022).

b. Flavonoid

Sebanyak 1 g ekstrak dicampur dengan etanol 5 mL, lalu dipanaskan sekitar 5 menit pada tabung reaksi. Setelah itu, ditambahkan 5 tetes HCl pekat, diikuti dengan penambahan 0,2 g bubuk magnesium. Jika terdapat perubahan warna larutan jingga, kuning, atau merah, maka dapat

disimpulkan bahwa larutan tersebut positif mengandung flavonoid (Arianta *et al.*, 2022).

c. Saponin

Sejumlah 1 g ekstrak dimasukkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL air suling (akuades) hingga ekstrak terendam sepenuhnya. Campuran tersebut kemudian dididihkan 2-3 menit, setelah itu didinginkan dan digoyang. Jika buih yang terbentuk tetap stabil, ekstrak tersebut dapat dinyatakan positif mengandung saponin (Arianta *et al.*, 2022).

d. Tanin

Sebanyak 1 g ekstrak ditambahkan akuades secukupnya sampai sampel terendam semuanya, kemudian ditambahkan 2-3 tetes FeCl_3 1%. Bila ekstrak membentuk warna biru kehitaman, maka dapat dikatakan ekstrak tersebut positif mengandung tannin (Arianta *et al.*, 2022).

e. Fenolik

Sebanyak 1 g ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 2 mL etanol 70% dan dipanaskan. Kemudian diambil 1 mL lalu ditetesi 2-3 tetes FeCl_3 5%. Amati perubahannya, hasil positif fenolik ditandai apabila terjadi pembentukan larutan berwarna hijau atau kebiruan (Arianta *et al.*, 2022).

7. Uji peredaman radikal bebas DPPH

a. Pembuatan larutan DPPH (0,1 mM)

Larutan DPPH 0,1 mM dibuat dengan cara serbuk DPPH (BM 394,32) sebanyak 3,95 mg dilarutkan bersama etanol p.a dalam labu takar 100 mL hingga tanda batas (Hasriyani *et al.*, 2022).

b. Pembuatan larutan ekstrak bunga kamboja putih

Ekstrak kental etanol bunga kamboja putih ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dalam etanol p.a 100 mL sehingga diperoleh larutan baku 1000 ppm. Rentang konsentrasi dari larutan tersebut dibuat dengan variasi konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 250 sebanyak 3 kali replikasi (Fitriani *et al.*, 2019).

c. Pembuatan larutan standar kuersetin

Larutan standar kuersetin dibuat dengan cara menimbang kuersetin 10 mg, lalu dilarutkan dalam etanol sampai batas volumenya 100 mL untuk mendapatkan larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm. Lalu dibuat rentang konsentrasi 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm, dan 9 ppm sebanyak 3 kali replikasi (Fitriani *et al.*, 2019).

d. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum yaitu, larutan induk DPPH 0,1 mM diambil sejumlah 2 mL kemudian dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 516 nm (Amelia & Nasution, 2022).

e. Penentuan *operating time*

Larutan kuersetin 5 ppm sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 2 mL larutan DPPH. Diukur serapan pada λ maksimum selama 0-60 menit dengan interval 1 menit hingga diperoleh serapan yang stabil (Fitriani *et al.*, 2019). Hasil pengukuran *operating time* diperoleh nilai absorbansi yang stabil pada menit ke 34 sampai 36.

f. Penetapan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH

Sejumlah 1 mL sampel ditambahkan 2 mL larutan DPPH. Setelah diinkubasi selama *operating time* yaitu 34 menit, serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada λ maksimum 516 nm dan pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Shofi *et al.*, 2020).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penentuan nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*)

Nilai absorbansi akan digunakan sebagai perhitungan persentase penghambatan (%inhibisi) dapat dihitung dengan menggunakan persamaan (2):

$$\%inhibisi = \frac{A_{kontrol} - A_{sampel}}{A_{kontrol}} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

Keterangan:

A kontrol = Nilai absorbansi DPPH pada panjang gelombang maksimal sebelum direaksikan dengan larutan sampel uji.

A sampel = Nilai absorbansi sampel pada panjang gelombang maksimal setelah direaksikan dengan larutan DPPH, begitu pula dengan standar.

Hasil data yang diperoleh dibuat persamaan regresi linier yang menggabungkan persentase penghambatan sebagai nilai y dengan konsentrasi sebagai nilai x dari setiap larutan sampel uji dan juga standar kuersetin.

$$y = bx + a \dots \dots \dots (3)$$

Keterangan:

- y = Persentase inhibisi (%)
- x = IC₅₀
- a = *Intercept* (perpotongan garis di sumbu y)
- b = *Slope* (kemiringan)

Persamaan regresi linear yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ dengan memasukkan nilai 50 sebagai y dan x merupakan nilai IC₅₀, dihitung menggunakan persamaan (3).

2. Analisis data

Analisis data IC₅₀ ekstrak etanol bunga kamboja putih menggunakan perangkat lunak *Statistical Program for Social Science* (SPSS) versi 25. Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dengan taraf kepercayaan 95%. Uji homogenitas menggunakan uji *Levene's test* dengan taraf kepercayaan 95%. Data yang terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji statistik *T-test independent* karena uji tersebut dapat digunakan untuk membandingkan dua kelompok.