

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis dari penelitian ini yaitu penelitian eksperimental dengan uji kualitatif dan kuantitatif. Pada kualitatif yang dilakukan uji kadar air, uji organoleptik dan skrining fitokimia sedangkan pada kuantitatif dilakukan uji peredaman radikal bebas DPPH.

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Program Studi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta dari bulan September-Desember 2024.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi yang digunakan adalah daun sambung nyawa yang diambil dari kebun di Gang kresna daerah Baturetno, Kecamatan Banguntapan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta (titik koordinat -7.8176312,110.4134488).
2. Sampel yang digunakan adalah daun sambung nyawa yang masih hijau pada usia tanaman 4 bulan dengan memetik daun ke 1-5 helai selain pucuk (Wijayanti, 2012) dan di panen pada pagi hari pukul 08.00-10.00 WIB.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu metode ekstraksi daun sambung nyawa.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu nilai IC_{50} .

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu tempat tumbuh, waktu panen, usia tanaman, waktu dan suhu pengeringan, waktu dan suhu ekstraksi, metode ekstraksi maserasi dan UAE.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak daun sambung nyawa merupakan ekstrak yang didapatkan melalui proses maserasi dan UAE dengan menggunakan pelarut metanol. Simplisia daun sambung nyawa diperoleh dari kebun di Gang kresna daerah Baturetno, Kecamatan Banguntapan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta (titik koordinat -7.8176312,110.4134488).
2. Aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dinyatakan dalam nilai IC_{50} yaitu dari konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan 50% dalam menghambat radikal bebas DPPH.

F. Alat Dan Bahan

1. Alat

Alat gelas (*Pyrex*), cawan porselin, grinder simplisia (*Fomac*), kompor listrik, kain saring, kertas saring, kaca arloji, kuvet, mikropipet (*ohaus*), *moisture balance* (*Ohaus MB-90*), neraca analitik (*Ohaus EX 225D*), oven, pipet tetes, pipet ukur (*Pyrex*), spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer*), sonikator (*GT-Sonic*), sendok tanduk, spatula, stopwatch, toples maserasi, dan tabung reaksi (*Iwaki Pyrex*).

2. Bahan

Akuades, amonia, *blue tip*, etanol (p.a), aluminium foil, $FeCl_3$ 1% (p.a), HCl pekat (p.a), H_2SO_4 (p.a), kuersetin (sigma aldrich), kain mori, kertas saring, reagen dragendorf (teknis), reagen mayer (teknis), reagen wagner (teknis), metanol (teknis), serbuk magnesium (p.a), simplisia daun sambung nyawa, dan DPPH (*2,2- diphenyl-1- picrylhydrazyl*) (*sigma aldrich*).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengumpulan Bahan dan Determinasi Tanaman

Daun sambung nyawa yang digunakan berasal dari kebun yang berlokasi di Gang kresna daerah Baturetno, Kecamatan Banguntapan,

Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta (titik koordinat - 7.8176312,110.4134488). Proses determinasi bagian daun tanaman yang dilaksanakan di Laboratorium Biologi, Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi ini dilakukan untuk memverifikasi keaslian bahan yang digunakan dalam penelitian.

2. Persiapan Sampel dan Pembuatan Serbuk Daun Sambung Nyawa

Daun sambung nyawa dipanen pada pukul 08.00-10.00 WIB sebanyak 2 kg dengan kriteria 1-5 helai daun dari bagian bawah batang kearah atas selain pucuk. Proses selanjutnya sampel disortasi basah dengan cara membersihkan kotoran yang menempel menggunakan air mengalir dan ditiriskan lalu dikering anginkan, setelah itu sampel dioven pada di suhu 40°C hingga kering (ditandai daun hancur ketika diremas) selama 3 hari (Aliya, 2019). Selanjutnya, simplisia daun sambung nyawa dihaluskan menggunakan grinder dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh hingga memperoleh serbuk yang halus dan homogen (Djumaati, 2018; Sinaga, 2017).

3. Ekstraksi Daun Sambung Nyawa

a. Metode maserasi

Ditimbang sejumlah 100 g simplisia daun sambung nyawa diekstraksi menggunakan pelarut metanol teknis sebanyak 1000 mL (1:10). Kemudian sampel didiamkan pada suhu ruang 25°C selama 1 jam dengan menggunakan toples maserasi dan diaduk pada menit ke-30 selama 5 menit. Selanjutnya, hasil ekstraksi disaring menggunakan kain saring lalu dilanjutkan dengan kertas saring hingga didapatkan filtrat. Ampas hasil penyaringan diremaserasi menggunakan 500 mL metanol selama 30 menit dan diaduk pada menit ke-15 selama 5 menit. Hasil ekstraksi disaring dengan cara yang sama menggunakan kain saring lalu dilanjutkan dengan kertas saring hingga diperoleh filtrat. Kedua filtrat digabungkan dan diuapkan menggunakan kompor listrik pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental daun sambung nyawa dan dihitung nilai rendemennya (Marwati, 2022).

b. Metode UAE

Ditimbang sejumlah 100 g simplisia daun sambung nyawa dan ditambahkan metanol teknis sebanyak 1000 mL (1:10). Sampel dibagi kedalam dua labu erlenmeyer, masing-masing wadah terdiri dari 50 g serbuk dan 500 mL pelarut serta mulut erlenmeyer ditutup menggunakan aluminium foil, kemudian diekstraksi menggunakan metode UAE dengan alat sonikator pada suhu ruang 25⁰ C selama 1 jam. Selanjutnya, hasil ekstraksi disaring menggunakan kain saring lalu dilanjutkan dengan kertas saring hingga didapatkan filtrat. Ampas hasil penyaringan diremaserasi sebanyak 500 mL metanol teknis selama 30 menit menggunakan sonikator, kemudian disaring dengan cara yang sama menggunakan kain saring lalu dilanjutkan dengan kertas saring hingga diperoleh filtrat. Filtrat digabungkan dan diuapkan menggunakan kompor listrik pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental daun sambung nyawa dan dihitung nilai rendemennya (Marwati, 2022). Rumus dari rendemen total ekstrak adalah sebagai berikut (Senduk, 2020):

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat simplisia awal}} \times 100 \%$$

4. Karakterisasi Ekstrak Daun Sambung nyawa

a. Uji kadar air

1 g ekstrak dalam cawan dimasukkan ke dalam *moisture balance*. Ekstrak diratakan agar menutupi permukaan cawan secara merata lalu ditutup. Kemudian diatur suhu 105°C dan ditunggu hingga alat tersebut berbunyi yang artinya proses telah selesai (Effendi, 2015).

b. Uji organoleptik

Uji organoleptik digunakan untuk pengenalan fisik dengan pancaindera dalam mendeskripsikan bentuk, bau, dan warna (Utami & Burhan, 2020).

c. Skrining fitokimia

a. Senyawa flavonoid

Ekstrak kental daun sambung nyawa ditimbang sejumlah 40 mg dan dilarutkan dengan 100 mL air panas. Kemudian larutan ekstrak tersebut dididihkan selama 5 menit lalu disaring. Selanjutnya sejumlah 5 mL filtrat ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan HCl pekat sejumlah 1 mL. Dinyatakan hasil positif apabila terbentuk warna kuning, jingga, atau merah (Cahyaningsih, 2019).

b. Senyawa fenolik

Ekstrak kental daun sambung nyawa ditimbang sejumlah 0,5 gram lalu ditambahkan 2 mL metanol dan ditambahkan 3 tetes FeCl_3 1%. Hasil dinyatakan positif fenolik ditandai adanya perubahan warna menjadi hijau, biru atau merah (Widiawati & Qodri, 2023).

c. Senyawa tanin

Ekstrak kental daun sambung nyawa ditimbang sejumlah 0,5 gram dan dilarutkan dengan 2 mL akuades di dalam tabung uji. Selanjutnya ditambahkan 3 tetes FeCl_3 1%, Jika membentuk warna biru-hijau atau biru-hitam maka dapat dikatakan positif mengandung tanin (Prasetyorini, 2019).

d. Senyawa saponin

Ekstrak kental daun sambung nyawa ditimbang sejumlah 0,5 gram dan dilarutkan dengan 10 mL air panas ke dalam tabung reaksi, didinginkan, dan dikocok kuat selama 10 detik. Bila terbentuk buih stabil selama tidak kurang dari 1 menit maka hasil positif mengandung saponin (Handayani, 2020).

e. Senyawa alkaloid

Ekstrak kental daun sambung nyawa sebanyak 4 gram ditambahkan 2 ml klorofom dan 10 mL ammonia, lalu disaring dan filtratnya dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 10 tetes H_2SO_4 p.a. Larutan diaduk sampai tercampur merata dan dibiarkan beberapa lama sampai terbentuknya dua lapisan. Diambil

1 mL lapisan atas lalu dimasukkan kedalam 3 tabung reaksi yang berbeda kemudian ditambahkan yaitu pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorf (masing-masing 1 mL). Hasil positif apabila terbentuk endapan putih setelah ditambahkan pereaksi mayer, endapan warna coklat setelah ditambahkan pereaksi wagner dan endapan jingga setelah ditambahkan pereaksi dragendorff (Makalalag, 2019). Dinyatakan positif alkaloid apabila dua diantara ketiga reagen tersebut hasilnya positif.

5. Uji Peredaman Radikal Bebas DPPH

a. Pembuatan larutan DPPH (0,1 mM)

Ditimbang serbuk DPPH sejumlah 3,94 mg dan dilarutkan dengan 100 mL etanol p.a dalam labu takar 100 mL (Fauzi, 2021). Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 8.

b. Pembuatan larutan uji sampel

Sejumlah 10 mg ekstrak daun sambung nyawa dilarutkan dengan 10 mL etanol p.a sampai volumenya pada tanda batas dan dihomogenkan serta memperoleh konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya larutan ini diencerkan dari berbagai variasi konsentrasi yaitu 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm dalam labu takar 10 mL. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 10 dan 11.

c. Pembuatan larutan standar kuersetin

Ditimbang 10 mg kuersetin kemudian dilarutkan menggunakan etanol p.a sebanyak 10 mL sampai volumenya pada tanda batas dan dihomogenkan serta memperoleh konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, larutan diencerkan dari berbagai seri konsentrasi yaitu 2, 3, 4, 5, dan 6 ppm dalam labu takar 10 mL (Amalia, 2023). Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 9.

d. Penentuan panjang gelombang maksimal

3 mL larutan DPPH 0,1 mM diambil. Kemudian pengukuran absorbansi DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis di rentang λ

500-560 nm sampai didapatkan λ maksimum dengan absorbansi tertinggi (Amalia, 2023).

e. Penentuan *operating time*

1 mL kuersetin 4 ppm dimasukkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 2 mL DPPH 0,1 mM lalu dikocok hingga homogen. Penentuan *operating time* dilakukan pada λ 516 nm selama 60 menit. Dimana menit yang menghasilkan absorbansi paling stabil maka digunakan sebagai *operating time* (Amalia, 2023).

f. Pengukuran absorbansi DPPH

Larutan DPPH 0,1 mM diambil 2 mL lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi dan kuvet. Kemudian diukur absorbansi DPPH menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada λ maksimal (Amalia, 2023).

g. Pengujian aktivitas peredaman radikal bebas DPPH

Sebanyak 1 mL sampel (larutan uji atau larutan kuersetin) ditambahkan 2 mL larutan DPPH 0,1 mM dan dihomogenkan. Selanjutnya, sampel diinkubasi selama *operating time* yaitu 26 menit pada ruangan yang gelap dan diukur absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ maksimal (Firdausia, 2023).

H. Metode Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Perhitungan nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*)

Aktivitas peredaman radikal bebas dapat dihitung dari nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Nilai IC₅₀ dapat ditentukan dengan menghitung y % inhibisi terlebih dahulu menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

Absorbansi kontrol : absorbansi larutan DPPH tanpa sampel.

Absorbansi sampel : absorbansi larutan DPPH yang telah dicampur dengan sampel.

Setelah mendapatkan % inhibisi dari berbagai konsentrasi, kemudian dilakukan penghitungan menggunakan persamaan regresi linier dimana x sebagai konsentrasi dan y sebagai % penghambatan dan penghitungan menggunakan rumus $y=bx+a$. Pada y digantikan dengan nilai 50 dan akan diperoleh nilai x.

2. Pengolahan data dan hasil penelitian

Data nilai IC_{50} dari ekstrak daun sambung nyawa hasil maserasi dan UAE dianalisis menggunakan *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) versi 25. Data yang didapatkan dilakukan uji normalitas (Shapiro-wilk) dan dilanjutkan pada uji homogenitas (Levene's test) dengan taraf kepercayaan 95%. Setelah itu, data yang terdistribusi normal dan homogen dapat dilanjutkan pada uji T-test *independent* digunakan untuk membandingkan dua sampel yang berbeda.