

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian kuantitatif dengan menggunakan tiga variabel meliputi variabel bebas yaitu tiga jenis pelarut, variabel terkontrol yaitu daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) dan variabel terikat meliputi kandungan fenol, flavonoid, dan aktivitas antioksidan (Leaves, 2016).

3.2 Sampel

Sampel penelitian ini adalah ekstrak daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*), berasal dari simplisia yang telah diekstraksi. Simplisia daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) berasal dari Gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Sumatera Utara sekitar hutan Tangkahan Taman Nasional. Daun Cep-cepan dalam bentuk ekstrak kemudian di fraksinasi lalu dilakukan uji antioksidan.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, alat-alat gelas, *blender*, cawan penguap, batang pengaduk, *water bath*, *rotatory evaporator*, corong pisah, spektrofotometer UV-Vis, mikropipet.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*), DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl*), n-heksan, etil asetat, aquadest, etanol 70%, methanol p.a, asam askorbat.

3.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian dilakukan selama 3 bulan terhitung dari bulan Juni sampai dengan bulan Agustus 2021.

3.5 Prosedur Percobaan

3.5.1 Pengumpulan dan Penyiapan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) metode DPPH menggunakan spektrofotometer UV- Vis dengan perbandingan asam askorbat.

3.5.2 Proses Pembuatan Fraksi daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*)

Hasil Ekstrak daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) kemudian difraksinasi dengan praktisi cair-cair menggunakan etil asetat dan n-heksan masing-masing dilakukan 4 kali pengulangan sebanyak 150 mL (4 x 150 mL) menggunakan alat corong pisah dengan cara dikocok kuat berkali-kali secara searah kemudian didapatkan hasil fraksi yaitu fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan (Alkandahri *et al.*, 2019).

3.5.3 Skrining Fitokimia

Skirinning Fitokimia mula-mula membuat filtrat A dan B, Filtrat A dibuat dengan cara mencampurkan 1 gram simplisia dengan akuades lalu dipanaskan kemudian didinginkan lalu siap untuk diuji, dan filtrat B dibuat dengan cara 1 gram simplisia dicampurkan dengan eter dan digerus kuat lalu siap untuk diuji. Skrining fitokimia meliputi:

3.5.4 Alkaloid

Masing-masing tabung reaksi yang berisi 2-3 mL filtrat A, ditambahkan dengan masing-masing 1% amonia dan kloroform. Kemudian diambil lapisan kloroform dan ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan HCl 1 N dan kocok kuat hingga terbentuk lapisan. Lapisan asam di pipet dan dibagi menjadi tiga tabung berbeda, tabung reaksi 1 ditambahkan pereaksi mayer, dan tabung reaksi 2 ditambahkan pereaksi dragendrof dan tabung ke tiga digunakan sebagai blangko. Hasil positif ditunjukkan pada tabung reaksi 1 dengan membentuk endapan putih dan tabung reaksi 2 merah kecoklatan (Tjitraesmi *et al.*, 2020).

3.5.5 Flavonoid

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan dengan 0,2 gram logam Mg dan 2 tetes HCl 2 N, kemudian tambahkan amil alkohol dan

kocok kuat, biarkan beberapa menit, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning sampai merah (Harborne, 1987).

3.5.6 Polifenol

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan FeCl_3 1% jika terbentuk warna biru kehitaman maka hasil yang didapatkan positif (Tjitraesmi *et al.*, 2020).

3.5.7 Tanin

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan pelarut gelatin 1% jika terbentuk endapan putih pada larutan menunjukkan hasil yang didapatkan positif (Tjitraesmi *et al.*, 2020).

3.5.8 Kuinon

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan larutan KOH 5%. Jika terbentuk warna kuning hingga merah maka menunjukkan hasil yang didapatkan positif (Tjitraesmi *et al.*, 2020).

3.5.9 Saponin

Filtrat filtrate A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan akuades dan dididihkan, kemudian filtrat dikocok dan didiamkan selama 15 menit. Setelah di diamkan atau setelah penambahan HCL apabila terbentuk busa menunjukkan hasil yang didapatkan positif (Harborne, 1987; Tjitraesmi *et al.*, 2020).

3.5.10 Monoterpenoid dan Seskuiterpenoid

Masukan filtrat filtrat B kemudian uapkan hingga kering. Lalu teteskan vanilin 10% dalam H_2SO_4 pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna-warna (Tjitraesmi *et al.*, 2020).

3.5.11 Triterpenoid dan Steroid

Masukan filtrat I filtrat B lalu diuapkan hingga kering, kemudian teteskan dengan pereaksi Lieberman-Burchard. Jika hasil positif senyawa golongan triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu dan senyawa golongan steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru kehijauan (Tjitraesmi *et al.*, 2020).

3.6 Uji Antioksidan Fraksi Daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*)

Uji antioksidan fraksi daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) terdiri dari pembuatan larutan DPPH, penentuan Panjang Gelombang Maksimum, pembuatan larutan blanko, pembuatan larutan asam askorbat, pembuatan larutan fraksi daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*), dan uji aktivitas antioksidan fraksi daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) (Agustini, 2020):

3.6.1 Pembuatan larutan DPPH

Larutan DPPH dibuat dengan konsentrasi 50 ppm yakni dengan menimbang DPPH sebanyak 5 mg kemudian tambahkan metanol p.a sampai 100 mL (0,1 mM).

3.6.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Ambil larutan DPPH sebanyak 4 mL pada kuvet kemudian dimasukkan pada spektrofotometri UV-Vis dan ukurnya pada panjang gelombang 517 nm untuk mendapatkan absorbansi $\pm 0,2-0,8$.

3.6.3 Pembuatan Larutan Blanko

Sebanyak 2 mL larutan DPPH di masukkan kedalam kuvet lalu ditambahkan dengan metanol p.a sebanyak 2 mL (dengan perbandingan 1:1), kemudian di inkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C, lalu diukur serapan nya pada Panjang gelombang 517 nm. Semua perlakuan di ruangan yang tertutup dan terhindar dari cahaya serta pengerjaan dilakukan replikasi sebanyak 4x.

3.6.4 Pembuatan Larutan Asam Askorbat

Pembuatan larutan baku asam askorbat pada konsentrasi 200 ppm lalu dibuat variasi konsentrasi 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, masing-masing variasi konsentrasi dilarutkan dalam 25 mL metanol p.a pada labu ukur 25 mL

3.6.5 Pembuatan Larutan Fraksi daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*)

Pembuatan larutan baku pada konsentrasi 200 ppm lalu dibuat variasi konsentrasi 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, masing-masing variasi konsentrasi dilarutkan dalam 25 mL metanol p.a pada labu ukur 25 mL.

3.7 Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*)

Pengujian dilakukan dengan cara memipet larutan induk **fraksi Cep-cepan (*Castanopsis costata*)** sebanyak 2 mL masing-masing konsentrasi kemudian ditambahkan 2 mL larutan DPPH. Lalu di inkubasi selama 30 menit. Kemudian ukur absorbansi nya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan perlakuan dilakukan berulang sebanyak 4x. setelah itu dilakukan pengukuran IC₅₀

$$\text{dengan } Y = \text{Min} + \frac{\text{Max}-\text{Min}}{1+\frac{x}{\text{IC}_{50}}-\text{Hill coefficient}} .$$

3.8 Analisis Data

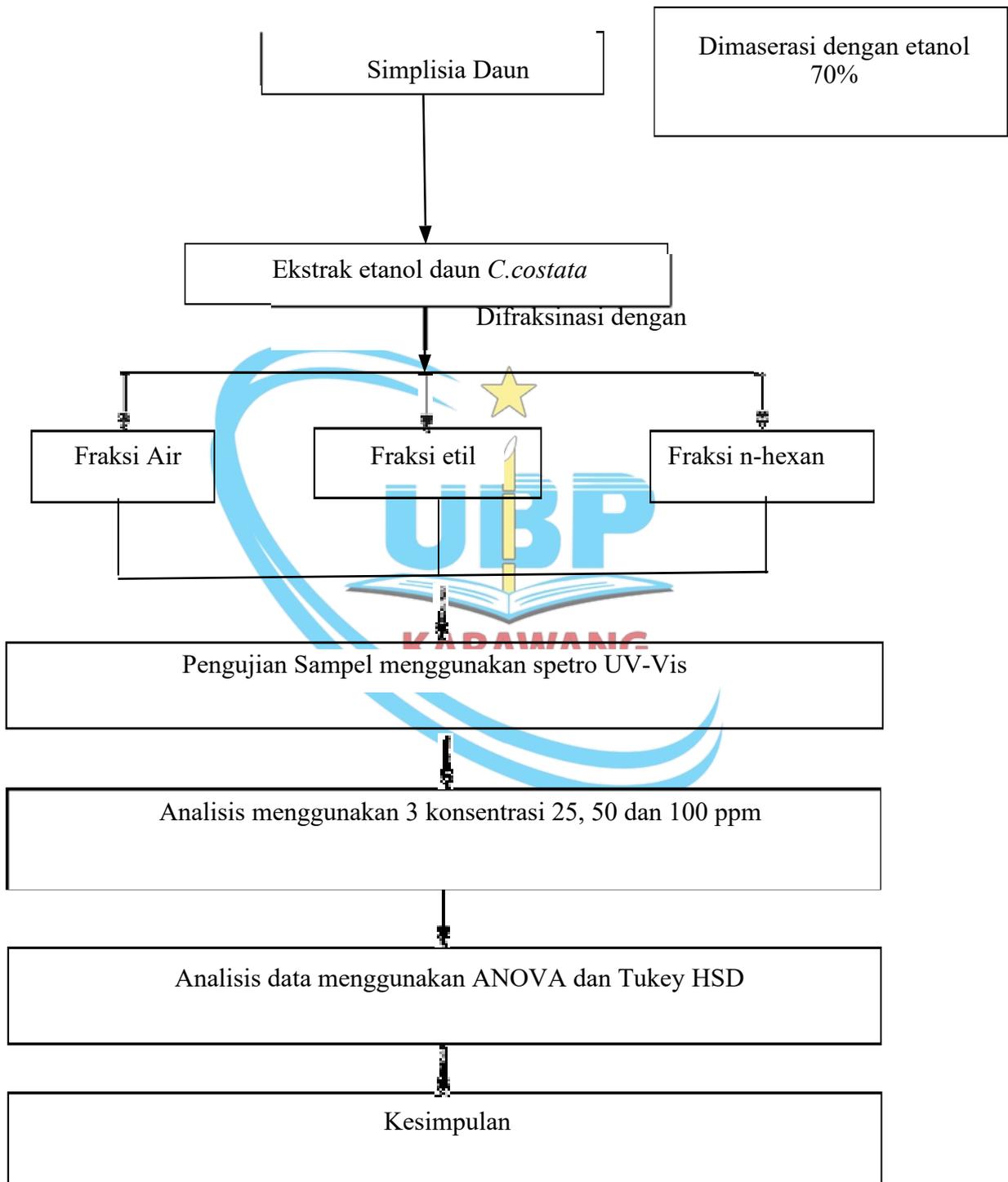
Hasil pengujian dinyatakan sebagai rata-rata±standar deviasi (SD) dari empat kali ulangan. Analisis statistika dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Graph Pad Prism* (Versi 9). Penentuan nilai IC₅₀ (konsentrasi di mana penghambatan 50% tercapai) diperoleh dari plot regresi menggunakan aplikasi AAT Bioquest.

3.9 Penentuan Nilai IC50

Dalam menentukan Parameter dari metode DPPH menggunakan nilai IC₅₀ (*inhibition concentration* 50%) atau kemampuan suatu sampel yang dapat meredam aktivitas radikal bebas sebesar 50%, IC₅₀ merupakan besaran konsentrasi inhibisi suatu larutan uji terhadap dalam menurunkan aktivitas radikal bebas sebesar 50%, dimana ketika nilai IC₅₀ semakin kecil maka akan semakin besar pula aktivitas antioksidan nya (Widyasanti *et al.*, 2016; Wulansari, 2018).

3.10 Diagram Alir Penelitian

Adapun skema sebagai berikut:



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian