

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam waktu 6 Bulan terhitung dari bulan Januari sampai Bulan Maret. Untuk tempat penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-Vis (*Thermo Scientific 33-PPPTS2017-L205-0006*), Neraca Analitik (*ae-ADAM*), plat KLT (*TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> MERCK 1.05554.0001*), Chamber, Lampu UV, Pipa Kapiler, *Rotary Evaporator* (*EYELA OSB-2100-CE*), Pinset, Vial coklat, Penggaris, Pensil, dan alat-alat yang lazim digunakan dilaboratorium.

#### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ekstrak Etanol Karang Lunak Sp4, Aluminium foil, Aquadest, Vitamin C p.a (*Coated Ascorbic Acid Type Ec, Code 0425117, Analysis 06202961*), DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) D9132-16, Metanol p.a (*MERCK*), Kloroform p.a (*MERCK*), Aceton (1090), Asam Formiat (*MERCK*), Asam Asetat (2789), N-heksan (*MERCK*).

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Ekstraksi Sampel

Sampel diekstraksi dengan pelarut etanol dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan selama 24 jam dengan 3 kali pengulangan. Hasil dari ekstraksi berupa ekstrak cair. Ekstrak cair

selanjutnya dikentalkan dengan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut yang terkandung di dalam ekstrak cair.

### 3.3.2 Uji Fitokimia

#### A. Uji Alkaloid

Sebanyak 4 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 ml kloroform dan 5 ml amoniak 10%, lalu ditambahkan 10 tetes asam sulfat 2M. Diambil bagian atas dari fase yang terbentuk, kemudian ditambahkan mayer. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan merah (Harborne, 1996 dalam Rumagit, 2015).

#### B. Uji Flavonoid

Ekstrak diambil sebanyak 1 ml, lalu ditambahkan dengan serbuk magnesium secukupnya dan 10 tetes asam klorida pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna hitam kemerahan, kuning atau jingga.

#### C. Uji Saponin

Tambahkan ekstrak dengan 10 ml air panas, kemudian ditambahkan asam klorida 2N dan kemudian dikocok kuat. Terbentuk buih stabil kurang lebih 10 menit setinggi 1-10 cm.

#### D. Uji Tanin

Tambahkan ekstrak dengan larutan besi (III) klorida 10%. Hasil positif menunjukkan warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan.

#### E. Uji Steroid dan Triterpenoid

Tambahkan ekstrak dengan 5 ml eter lalu dipipet. Diletakkan dalam cawan penguap hingga pelarut menguap.

Filtrat ditambahkan 2-3 tetes pereaksi LB. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna aungu (triterpenoid) dan warna abiru (steroid).

### 3.3.3 Uji Kualitatif Aktivitas Antioksidan dengan KLT

Sebelum melakukan uji radikal secara kuantitatif, terlebih dahulu dilakukan uji kualitatif dengan menggunakan KLT dimana fase geraknya disesuaikan. Untuk mengetahui bercak mana yang memiliki aktifitas antioksidan, maka digunakan pereaksi semprot yaitu larutan DPPH, senyawa yang dinyatakan dapat menangkap radikal bebas ditandai dengan menunjukkan bercak berwarna kuning pucat dengan latar belakang ungu.

### 3.3.4 Tahapan Uji Aktivitas Antioksidan

Pada masing-masing ekstrak diuji aktivitas antioksidan dengan metode Blois. Nilai  $IC_{50}$  dihitung dengan menggunakan rumus persamaan regresi.

#### A. Pembuatan larutan DPPH

Sejumlah 3 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 60 mL metanol didapatkan konsentrasi DPPH 50 ppm.

#### B. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH yang telah dibuat dengan konsentrasi 50 ppm spektrum serapannya diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm hingga 800 nm. Ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

#### C. Pembuatan Larutan kontrol

Larutan kontrol yang digunakan adalah 2,0 ml metanol p.a dimasukkan ke dalam vial coklat dan ditambahkan 2,0 ml DPPH dikocok hingga homogen. Didiamkan diruang gelap

pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit dan diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515,679 nm, kemudian dicatat serapannya.

#### **D. Persiapan Larutan Uji**

- a) Pembuatan larutan induk (konsentrasi 1000 ppm)

Timbang 50 mg ekstrak etanol karang lunak sp4 kemudian masukan kedalam beaker glass dan dilarutkan dalam 50 mL metanol p.a hingga homogen.

- b) Pembuatan larutan seri (konsentrasi 40, 60, 80, 100 dan 120 ppm)

Pipet masing-masing 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1,0 ; dan 1,2 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dicukupkan volumenya dengan metanol p.a hingga 10 ml.

- c) Pengujian

Dari masing-masing larutan uji dipipet 2,0 ml dimasukkan ke dalam vial coklat, ditambahkan 2,0 ml DPPH 50 ppm dikocok hingga homogen, didiamkan diruang gelap pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit dan diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515,679 nm, kemudian dicatat serapannya.

#### **E. Pembuatan Larutan Vitamin C p.a sebagai Pembanding**

- a) Pembuatan larutan induk (konsentrasi 100 ppm)

Timbang 50 mg zat kemudian masukan kedalam botol coklat dan dilarutkan dalam 50 ml metanol p.a hingga homogen.

- b) Pembuatan larutan seri (konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 ppm)  
 Dipipet masing-masing 0,2; 0,4; 0,6; dan 0,8 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dicukupkan volumenya dengan metanol p.a hingga 10 ml.
- c) Pengujian  
 Dari masing-masing larutan uji dipipet 2,0 ml dimasukkan ke dalam vial coklat, ditambahkan 2,0 ml DPPH 50 ppm, kocok sampai homogen. Untuk larutan kontrol dipipet 2,0 ml metanol lalu ditambahkan DPPH 50 ppm 2,0 ml kemudian kocok hingga homogen, didiamkan pada suhu 37°C selama 30 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang 515,679 nm, kemudian dicatat serapannya.

### 3.3.5 Uji Penentuan IC<sub>50</sub>

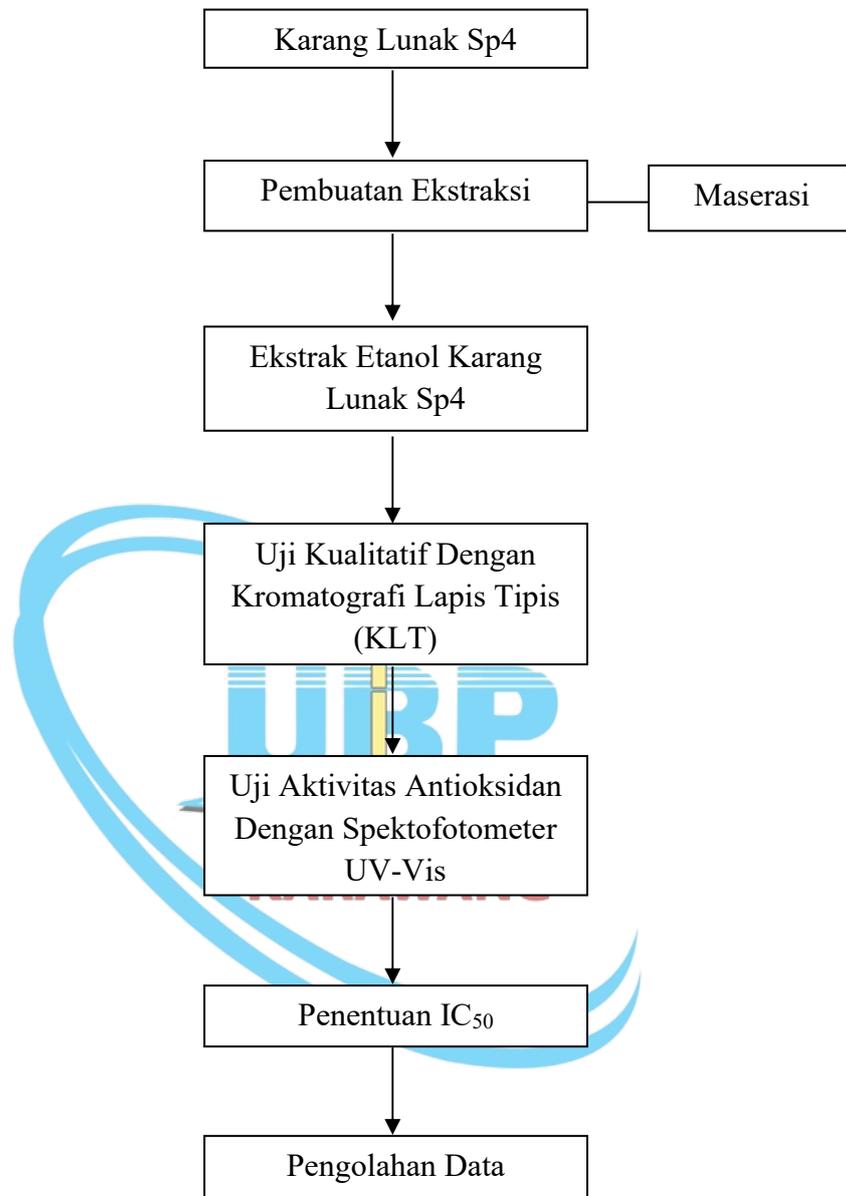
Nilai IC<sub>50</sub> dihitung berdasarkan presentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel dengan rumus :

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Absorban Blangko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorban Blangko}} \times 100\% \dots \text{Equation 3.1}$$

Setelah didapatkan presentasi inhibisi dari masing-masing konsentrasi, kemudian ditentukan persamaan  $y = a + bx$  dengan perhitungan secara regresi linear dimana  $x$  adalah konsentrasi (ppm) dan  $y$  adalah presentase inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *inhibition concentration* 50%. (IC<sub>50</sub>) yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC<sub>50</sub> didapatkan dari nilai  $x$  setelah mengganti  $y = 50$ . Dari persamaan  $y = a + bx$  dapat dihitung nilai IC<sub>50</sub> dengan menggunakan rumus :

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b} \dots \dots \text{Equation 3.2}$$

### 3.4 Diagram Alir Penelitian



**Gambar 3.1** Diagram Alir Penelitian