

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian analisis aktivitas antioksidan batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq*) yang digunakan yaitu penelitian praeksperimental dengan rancangan *one shot case study*. Penelitian ini menerapkan rancangan dasar berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan 3 sampel. Penelitian ini menetapkan 3 sampel ekstrak, yaitu sampel pertama menggunakan ekstrak n-heksana batang kangkung pagar, kedua menggunakan ekstrak etil asetat batang kangkung pagar, dan yang ketiga ekstrak etanol batang kangkung pagar dengan menggunakan metode ABTS dilakukan secara triplo. Disetiap sampel melakukan uji fitokimia dan uji aktivitas antioksidan dengan mengukur  $IC_{50}$ .

#### **3.2 Sampel**

Bahan baku yang digunakan sebagai sampel penelitian ini adalah simplisia batang kangkung pagar yang diperoleh di Balitro Bandung.

#### **3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan**

##### **3.3.1 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan yaitu ekstrak batang kangkung pagar, aquadest (Merck), etil asetat (Merck), n-heksana (Merck), etanol 96% (Sidomukti Chemical), ABTS (2,2'-azino-bis (3-

etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat),  $K_2S_2O_8$  (Kalium Persulfar), vitamin C (Sigma-Aldrich), alumunium foil, dan plat KLT silika gel GF254 (Merck).

### 3.3.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat Soxhlet, rotary evaporator (Buchi), oven (Memmert), neraca analitik (Sartorius), mikropipet (Eppendorf), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), vial coklat (Pyrex), labu ukur (Pyrex), pengayak 40 mesh, bejana kromatografi dan alat alat gelas (Pyrex).

## 3.4 Variabel Penelitian

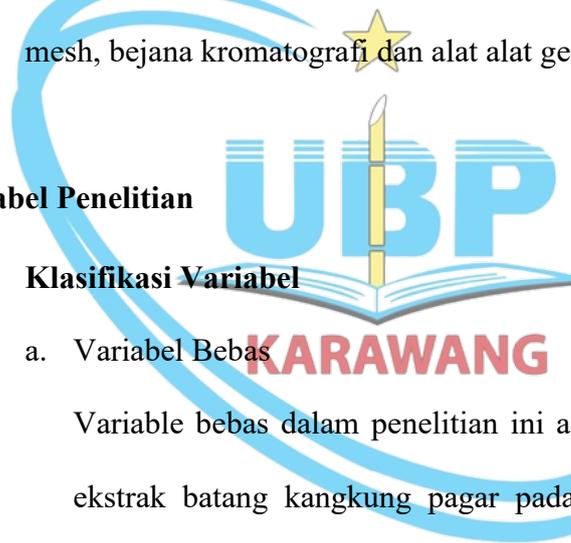
### 3.4.1 Klasifikasi Variabel

#### a. Variabel Bebas

Variable bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak batang kangkung pagar pada sampel n-heksana, etil asetat, dan etanol yang diperoleh diambil dari sampel dengan 3 kali pengulangan

#### b. Variabel Terikat

Variable terikat dari penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dengan metode ABTS (%IC<sub>50</sub>), Bobot Jenis, Kadar air, Kadar sari larut air dan larut etanol, skrining fitokimia.



### 3.4.2 Definisi Oprasional Variabel

Berikut ini adalah definisi oprasional variable yang terdapat dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut :

**Tabel 3.1** Definisi Oprasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat ukur	Skala	Hasil ukur
<b>Variabel Bebas</b>					
1	Konsentrasi ekstrak batang kangkung pagar pada sampel n-heksana, etil asetat, dan etanol	Konsentrasi ekstrak yang diperoleh diambil dari sampel dengan 3 kali pengulangan	Pengujian statistik menggunakan persamaan linear dari %IC <sub>50</sub>	nominal	1 : n-heksana 2 : etil asetat 3 : etanol
<b>Variable terikat</b>					
2	Aktivitas antioksidan	Aktivitas antioksidan merupakan suatu kemampuan ekstrak	Spektrofotometri UV-Vis	Rasio	Persen (%)

		batang			
		kangkung			
		pagar untuk			
		menangkap			
		radikal			
		ABTS			
4	%IC <sub>50</sub>	<i>inhibitor</i>	Persamaan	Rasio	Persen (%)
		<i>concentratio</i>	linear		
		$n$ (%IC <sub>50</sub> )			
		merupakan			
		nilai dosis			
		ekstrak			
		batang			
		kangkung			
		pagar yang			
		mendapatka			
		$n$ hasil			
		penangkapa			
		$n$ 50% dari			
		radikal			
		ABTS			
5	Bobot jenis	Perbandinga	Piknometer	Rasio	g/L
		$n$ kerapatan			

---

dari suatu  
zat terhadap  
kerapatan air

---

6 Kadar air Jumlah Moisture Rasio %

kandungan  
air suatu  
bahan yang  
dapat

dinyatakan

berdasarkan

berat basah

dan berat

kering

---

7 Kadar sari Untuk Persamaan Rasio %

larut air dan menentukan kadar sari

larut etanol kemampuan

dari bahan

baku

simplisia

tersebut

apakah

tersari dalam

pelarut air

---

		dan pelarut organic			
8	Skrining fitokimia alkaloid	Skrining fitokimia adalah metode yang dapat digunakan untuk mengetahui komponen senyawa aktif yang terdapat pada sampel	Reaksi kimia	nomi nal	1 : Positif 2 : Negatif
9	Skrining fitokimia flavonoid	Skrining fitokimia adalah metode yang dapat digunakan untuk mengetahui	Reaksi kimia	nomi nal	1 : Positif 2 : Negatif



		komponen			
		senyawa			
		aktif yang			
		terdapat			
		pada sampel			
10	Skrining	Skrining	Reaksi kimia	nomi	1 : Positif
	fitokimia	fitokimia		nal	2 : Negatif
	saponin	adalah			
		metode yang			
		dapat			
		digunakan			
		untuk			
		mengetahui			
		komponen			
		senyawa			
		aktif yang			
		terdapat			
		pada sampel			
11	Skrining	Skrining	Reaksi kimia	nomi	1 : Positif
	fitokimia	fitokimia		nal	2 : Negatif
	tanin	adalah			
		metode yang			
		dapat			

		digunakan untuk mengetahui komponen senyawa aktif yang terdapat pada sampel			
12	Skrining fitokimia polifenol	Skrining fitokimia adalah metode yang dapat digunakan untuk mengetahui komponen senyawa aktif yang terdapat pada sampel	Reaksi kimia	nomi nal	1 : Positif 2 : Negatif
13	Skrining fitokimia	Skrining fitokimia	Reaksi kimia	nomi nal	1 : Positif 2 : Negatif

---

steroid adalah metode yang dapat digunakan untuk mengetahui komponen senyawa aktif yang terdapat pada sampel

---

### 3.5 Prosedur Penelitian

Tahapan kerja dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

#### 3.5.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan kebenaran suatu tanaman batang kangkung pagar yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman batang kangkung pagar. Determinasi tanaman batang kangkung pagar dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu Malang, Jawa Timur.

### 3.5.2 Pengolahan Sampel

Tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kangkung pagar pada bagian batang. Sempel diberi perlakuan sebelum dilakukannya ekstraksi yaitu sampel batang kangkung pagar sebanyak 2000 gram disortasi basah, dibersihkan dari pengotor, dan dicuci menggunakan air mengalir. Kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 45°C selama 4 hari agar kandungan air yang ada di dalam sampel berkurang. Batang kangkung pagar yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan dengan ukuran mesh 40 sampai diperoleh serbuk batang kangkung pagar dengan tingkat kehalusan yang diinginkan kemudian disimpan dalam wadah kering dan tertutup dan sampel siap diekstraksi. Pengolahan sampel batang kangkung pagar dilakukan di Balitro Bogor, Jawa Barat.

### 3.5.3 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel batang kangkung pagar yaitu dengan cara *Soxhlet* dengan menggunakan 3 pelarut yaitu N-heksana, etil asetat, dan etanol. Metode *Soxhlet* adalah metode ekstraksi dengan menggunakan pemanasan. Proses metode soxhletasi yaitu dengan cara masukkan 100 gram batang kangkung pagar yang sudah dihaluskan kedalam tabung alat *Soxhlet*. Kemudian pelarut dimasukkan kedalam labu alas bulat dan setelah itu mulai dilakukan pemanasan. Volume pelarut yang digunakan masing-masing sebesar

500 mL, 1000 mL, dan 1500 mL, sehingga didapatkan perbandingan antara bahan-pelarut yaitu 1:5, 1:10, dan 1:15. Kemudian pelarut akan mendidih, menguap, mengembun pada pipa f kemudian masuk kedalam selongsong yang dibantu oleh kondensor. Pelarut akan naik kedalam sifon, dan 1 siklus akan penuh dan akan Kembali lagi kebawah yang artinya pelarut tersebut akan menjadi cair dan menetes melalui simplisia dan menarik komponen simplisia. Tetesan pelarut yang berisi komponen yang terekstraksi jatuh ke dalam labu. Proses tersebut akan berlangsung berulang-ulang sampai diperoleh ekstrak yang tidak berwarna atau bening. Soxhletasi dalam  $\pm 6$  jam akan melakukan beberapa siklus untuk mendapatkan hasil yang baik. Setelah itu ekstrak cair yang diperoleh disatukan dan dipekatkan yang diperoleh dengan proses pengentalan dengan *rotary evaporator* yang akan menghasilkan ekstrak kental (Mamanto *et al.*, 2014). Ekstraksi Batang kangkung pagar dilakukan di PT. Palapa Muda Perkasa Depok, Jawa Barat.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot yang dieproleh}}{\text{bobot bahan awal}} \times 100\%$$

#### 3.5.4 Bobot Jenis Ekstrak

Menimbang piknometer dalam keadaan kosong dalam volume tertentu. Kemudian piknometer diisi penuh dengan ekstrak sebanyak 5% dan ditimbang dengan berat ekstrak yang mempunyai volume 25 mL pada suhu 25°C, sehingga dapat ditetapkan kerapatan

ekstrak (Fikayuniar., 2020). Bobot jenis ekstrak dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Bobot jenis ekstrak} = \frac{\text{kerapatan ekstrak}}{\text{kerapatan air}}$$

### 3.5.5 Kadar Air Secara Gravimetri

Menimbang cawan kosong yang dinyatakan sebagai  $W_0$ . Memasukkan sejumlah ekstrak kedalam cawan kosong yang telah diketahui bobotnya ditimbang  $W_1$ , kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu  $105^\circ\text{C}$  selama 3 jam. Dinginkan dalam desikator selama 15-30 menit, lalu ditimbang dan dinyatakan sebagai  $W_2$  (Depker RI., 2008). Kadar air dapat ditetapkan dalam rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume air} \times \text{bobot jenis air}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

### 3.5.6 Kadar Sari

Kadar sari terdapat dua bagian yaitu kadar sari larut dalam air dan kadar sari larut dalam etanol :

#### 1. Kadar Sari Larut Dalam Air

Menimbang 5 gram ekstrak dan dimasukkan kedalam labu 100 mL, kemudian ditambahkan air kloroform P sambil dikocok berkali-kali selama 6 jam dan dibiarkan selama 18 jam. Saring dan uapkan 20 mL filtrat sampai kering dalam cawan dangkal yang sudah ditimbang. Pada suhu  $105^\circ\text{C}$  residu

dipanaskan hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % sari yang larut dalam air (Depkes RI., 2008).

## 2. Kadar Sari Larut Dalam Etanol

Menimbang 5 gram ekstrak dan dimasukkan kedalam labu 100 mL, kemudian ditambahkan etanol (95%) sambil dikocok berkali-kali selama 6 jam dan dibiarkan selama 18 jam. Saring dan uapkan 20 mL filtrat sampai kering dalam cawan dangkal yang sudah ditimbang. Pada suhu 105°C residu dipanaskan hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % sari yang larut dalam etanol (95%) (Depkes RI., 2008).

Kadar persen sari larut dalam air dan kadar persen sari larut dalam etanol dapat ditetapkan sebagai berikut :

$$\text{Kadar Sari} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times Fp \times 100\%$$

### 3.5.7 Susut Pengerinan

Susut pengerinan adalah pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105°C selama 30 menit atau sampai konstan yang dapat dinyatakan dalam persen (Depkes RI., 2008).

$$\text{Susut Pengerinan} = \frac{(\text{bobot awal} - \text{bobot akhir})}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

### 3.5.8 Skrining Fitokimia

Uji fitokimia simplisia pada batang kangkung pagar yaitu sebagai berikut :

#### 1. Alkaloid

Serbuk simplisia dibasahkan dengan ammonia dan digerus menggunakan mortar, kemudian tambahkan beberapa mL kloroform, setelah itu gerus kuat. Lapisan kloroform disaring menggunakan pipet yang disumbat dengan kapas dan masukkan ke dalam tabung reaksi. Filtrasi dikocok dengan HCl 2N dan kocok kuat hingga membentuk dua lapisan. Lapisan asam dipipet dan dibagi menjadi tiga bagian yaitu filtrat I digunakan sebagai blanko, filtrat II penambahan pereaksi Dragendroff dengan menghasilkan endapan jingga coklat yang menunjukkan bahwa adanya alkaloid, dan filtrat III penambahan pereaksi mayer dengan menghasilkan endapat putih atau kekeruhan yang menunjukkan adanya alkaloid (Fikayuniar, L., 2020).

## 2. Flavonoid

Serbuk simplisia ditambahkan dengan beberapa mL air panas dan di didihkan lalu disaring. Filtrat dari hasil pemanasan ditambahkan Mg, HCl 2N, dan amil alkohol. Setelah disatukan kocok yang kuat dan dibiarkan hingga memisah. Menghasilkan warna kuning sampai merah yang ditarik dengan amil alkohol yang menunjukkan adanya flavonoid (Fikayuniar, L., 2020).

## 3. Saponin

Serbuk simplisia dalam tabung reaksi di didihkan dalam beberapa mL air, dan dinginkan, kemudian disaring. Filtrat dari

hasil pemanasan dikocok vertikal dalam tabung reaksi. Pada penambahan asam klorida atau dilakukan pendiaman selama beberapa menit akan terbentuknya busa yang persisten. Jika buih terbentuk kurang dari 10 menit maka standar tinggi busa yaitu 1-10 cm yang menunjukkan bahwa adanya golongan saponin (Fikayuniar, L., 2020).

#### 4. Tannin

Serbuk simplisia dalam tabung reaksi di didihkan dalam beberapa mL air, dan dinginkan, kemudian disaring. Kemudian ditambahkan larutan gelatin 1% dan akan terbentuknya endapan putih yang menunjukkan bahwa adanya tannin (Fikayuniar, L., 2020).

#### 5. Polifenolat

Serbuk simplisia dalam tabung reaksi di didihkan dalam beberapa mL air, dan dinginkan, kemudian disaring. Kemudian ditambahkan larutan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1% akan menghasilkan warna biru-hitam yang menunjukkan bahwa adanya polifenolat (Fikayuniar, L., 2020).

#### 6. Triterpenoid dan steroid

Simplisia digerus dengan beberapa mL eter, dan disaring menggunakan pipet yang disumbat dengan kapas dan ditempatkan dalam cawan penguap hingga kering. Ditetaskan peraksi Liberman Buchard kedalam residu akan terbentuknya

warna ungu yang menunjukkan bahwa adanya golongan triterpenoid, dan jika terbentuknya warna biru hijau menunjukkan bahwa adanya golongan steroid (Fikayuniar, L., 2020).

### 3.5.9 Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis kualitatif kandungan senyawa batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea*) menggunakan profil KLT. Kemudian fase diam KLT terbuat dari silika GF<sub>254</sub> dengan perbandingan fase gerak tertentu. Ekstrak dan tiga fraksi ditutulkan diatas lempeng KLT 5×1 cm, batas atas 0,5 cm, dan batas bawah 1 cm dengan menggunakan pipa kapiler. Kemudian dibiarkan beberapa saat hingga pelarut tersebut menguap. Masukkan pelat silika kedalam bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan cairan pengembang. Ketika pengembang sudah sampai ke garis depan maka proses kromatografi diberhentikan. Hasil elusi didiamkan sampai kering dan disemprot dengan reagen ABTS dan sitroborat (Fikayuniar., 2020).

### 3.5.10 Pengujian Antioksidan Menggunakan Metode ABTS

Uji Aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS mengacu pada (Saputri *et al.*, 2020) yang telah dimodifikasi. Tahapannya yaitu sebagai berikut :

1. Larutan Kalium Persulfat 2,6 mM

Kalium Persulfat ( $K_2S_2O_8$ ) dibuat 50 ppm kemudian ditimbang sebanyak 3,514 mg dan diencerkan menggunakan aquadest sampai tanda batas 5 mL. Inkubasi selama 12 jam (Utami., 2020).

## 2. Larutan ABTS 7,4 mM

Menimbang ABTS sebanyak 5,07525 mg kemudian masukkan kedalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan menggunakan aquadest sampai tanda batas. Inkubasi selama 12 jam. Larutan  $K_2S_2O_8$  2,6 mM dan larutan ABTS 7,4 mM masing-masing dipipet sebanyak 1,25 mL dengan perbandingan 1:1. Campurkan larutan  $K_2S_2O_8$  dan larutan ABTS di dalam labu ukur kemudian campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit sampai berwarna hijau gelap. Setelah terjadi perubahan warna maka larutan tersebut diinkubasi Kembali di dalam kulkas selama 2 x 24 jam (2 hari).

Campuran larutan ABTS dibuat dengan konsentrasi 50 ppm dalam 100 mL etanol p.a dengan cara memipet 246,9  $\mu$ L dari larutan induk ABTS 2030,1 ppm dan ditambahkan etano p.a sampai 100 mL.

## 3. Larutan induk standar vitamin C dengan etanol 96%

Timbang vitamin C kurang lebih 50 mg dan tambahkan 25 mL etanol 96% sampai tanda batas yang akan menghasilkan larutan induk 1000 ppm (Nasir., 2021).

#### 4. Larutan Blanko

Larutan ABTS 7,4 mM dipipet sebanyak 2462,9  $\mu\text{L}$  dan dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, kemudian dilarutkan menggunakan etanol 96% sampai tanda batas (Utami., 2020).

#### 5. Pembuatan Deret Larutan Standar Vitamin C

Membuat deret standar vitamin C dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm, dan 9 ppm dengan cara dipipet masing-masing konsentrasi dari larutan induk vitamin C (100 ppm) menggunakan mikropipet (Nasir., 2021).

#### 6. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak

Membuat induk ekstrak n-heksana, etil asetat, dan etanol batang kangkung pagar dengan konsentrasi 100 ppm, kemudian setelah optimasi pengukuran absorban dengan ABTS yang menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 734 nm. Dibuatlah berbagai variasi konsentrasi yaitu 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, dan 150 ppm dari ekstrak n-heksana, etil asetat, dan etanol batang kangkung pagar dari induk 50 ppm (Utami., 2020).

#### 7. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan ABTS 7,4 mM dipipet sebanyak 2462,9  $\mu\text{L}$  dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang sudah dilapisi aluminium foil dan dilarutkan menggunakan etanol 96% hingga

tanda batas. Inkubasi selama 6 menit dan panjang gelombang diukur pada kisaran kisaran 400-800 nm yaitu pada panjang gelombang sesuai literatur adalah 734 nm (Utami., 2020).

#### 8. Pembuatan Laruta Uji

Sejumlah milligram ekstrak batang kangkung pagar dengan pelarut etanol, N-heksan, dan etil asetat ditimbang dan dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan menggunakan etanol 96% sampai tanda batas. Kemudian pipet 1 mL dari variasi konsentrasi dan ditambahkan larutan ABTS  $\mu\text{g/mL}$  (perbandingan 1:1). Campuran tersebut dihomogenkan dan diukur panjang gelombang maksimum dan absorban pada waktu optimum (Utami., 2020).

Aktivitas antioksidan diukur sebagai penurunan absorbansi larutan ABTS akibat adanya penambahan larutan sampel dan dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ Peredaman ABTS} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Abs Sampel} - \text{Abs Blanko Sampel}}{\text{Abs Kontrol}} \right) \right] \times 100\%$$

Keterangan :

- Sampel = 1 mL larutan sampel + 1 mL ABTS
- Blanko sampel = 1 mL larutan sampel + 1 mL (etanol, N-heksan, dan etil asetat)
- Kontrol = 1 mL ABTS + 1 mL (etanol, N-heksan, dan etil asetat)

## 9. Pengujian Antioksidan dengan Metode ABTS

Dipersiapkan kurva kalibrasi dengan menggunakan deret asam galat. Kapasitas antioksidan dapat dinyatakan sebagai berat setara dengan vitamin C tiap gram serbuk simplisia. Perhitungan total antioksidan dilakukan dengan persamaan regresi linear yaitu sebagai berikut :

$$y = b x + a$$

Keterangan : y = Absorbansi Sampel

x = Kadar antioksidan sampel (konsentrasi

IC<sub>50</sub>)

b = Slop dari kurva standar

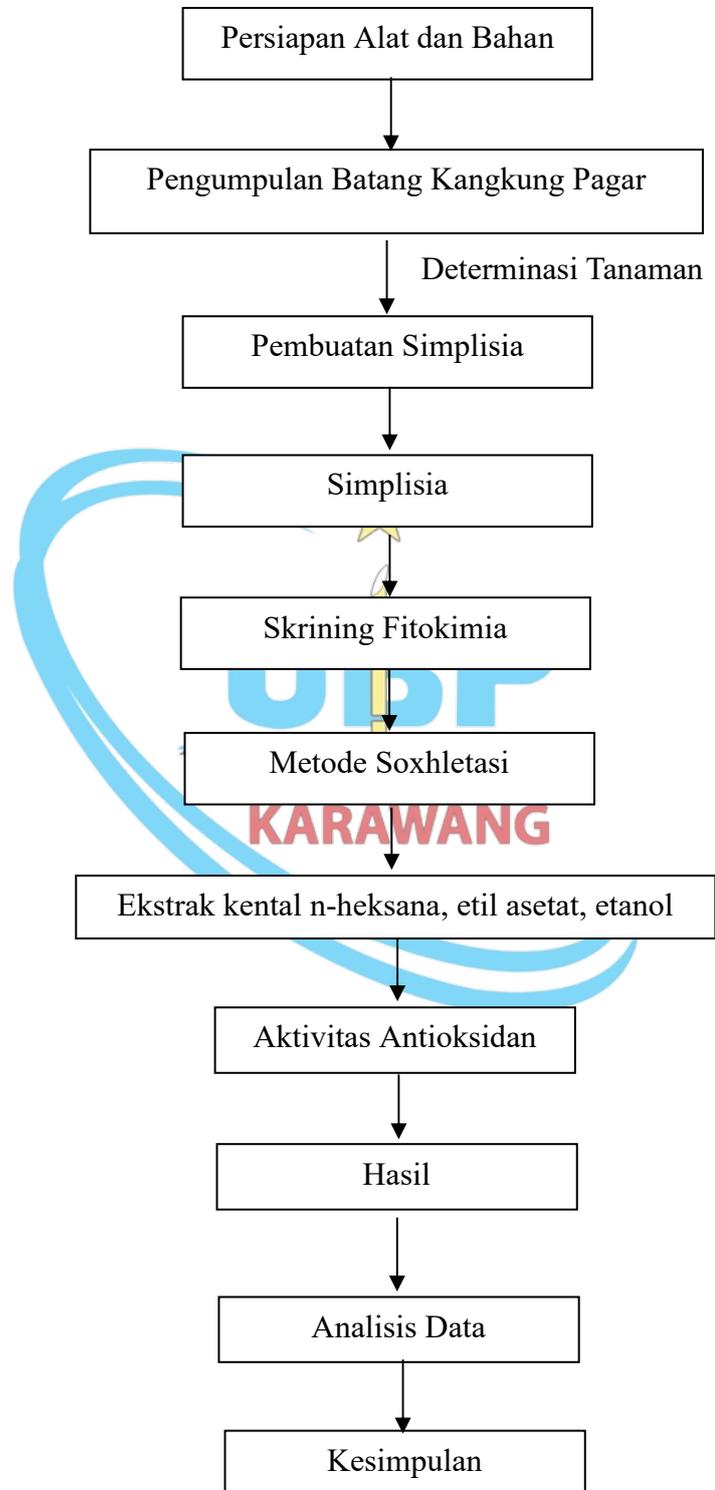
a = Intersep dari kurva standar

### 3.6 Analisis Data

#### 3.6.1 Pengolahan Data Statistik

Analisis data kualitas dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yaitu meliputi analisis antioksidan (IC<sub>50</sub>) dan konsentrasi ekstrak (n-heksana, etil asetat, dan etanol) yang dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dan meliputi bobot jenis, kadar air, kadar sari larut air dan larut etanol, dan skrinning fitokimia. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam yaitu *Anova One Way*.

### 3.7 Kerangka Penelitian



**Gambar 3.1.** Kerangka Penelitian