

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan eksperimental dengan cara setiap sampel melakukan uji skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq*) dengan mengukur EC₅₀. Penelitian ini menetapkan 3 sampel ekstrak yaitu ekstrak n-heksan, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol dengan menggunakan metode FRAP dan DPPH yang dilakukan secara triplo.

3.2 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang pada bulan April-Agustus 2022.

3.3 Sampel

Sampel yang digunakan adalah ekstrak daun kangkung pagar yang di dapat dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Ballitro Instalasi Penelitian dan Pengembangan Teknologi Pertanian di Kabupaten Bogor.

3.4 Bahan dan Alat

3.4.1 Bahan

Bahan yang digunakan sebagai penelitian adalah ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomeae carnea*), etanol (SMART-LAB®), n-heksan (EMSURE®), etil asetat (EMSURE®), torolox (SIGMA-ALDRICH®), natrium asetat trihidrat (EMSURE®), asam asetat pekat (EMSURE®), HCl (EMSURE®), TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) (SIGMAALDRICH®), FeCl₃.6H₂O (EMSURE®), aquadest, DPPH, serbuk magnesium (Mg), pereaksi mayer, pereaksi dragendorf, pereaksi liberman buchard, kertas saring, kertas perkamen, alumunium poil.

3.4.2 Alat

Alat yang digunakan sebagai penelitian adalah alat-alat gelas (PYREX®), labu ukur, pipet tetes, sendok tanduk, cawan petri, tabung reaksi (Iwaki), corong

kaca (Herma), gelas beaker (Duran), kaca arloji, neraca analitik (Ae Adam), spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific), mikropipet (Fisherbrand), inkubator (Gemmyco), botol coklat.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1. Klasifikasi Variabel

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian yaitu ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoeae carnea*) dengan variasi konsentrasi n-heksan, etanol dan etil asetat.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian yaitu skrining fitokimia dan analisa antioksidan ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoeae carnea*) dengan metode FRAP dan DPPH.

3.5.2. Definisi Operasional Terikat

a. Variabel Bebas

- Ekstrak daun kangkung pagar diperoleh dari presipitasi dan pengeringan tanaman kangkung pagar
- Pelarut n-heksan yang merupakan senyawa hidrokarbon
- Pelarut etanol yang merupakan pelarut polar yang sering digunakan dalam mengidentifikasi senyawa flavonoid
- Pelarut etil-asetat yang merupakan pelarut semi polar yang dapat menarik senyawa polar atau nonpolar

b. Variabel Terikat

- Skrining fitokimia dan analisa antioksidan dengan metode FRAP dan DPPH untuk mengetahui kandungan antioksidan yang terdapat didalam ekstrak daun kangkung pagar

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq*) dilakukan di UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICCA BATU, untuk diidentifikasi dan memastikan tanaman yang diteliti sesuai dengan morfologi tumbuhan agar dapat mengetahui kebenaran identitas tanamannya.

3.6.2 Pengolahan Sampel

Setelah melakukan determinasi pada tanaman daun kangkung pagar dicuci dengan air yang mengalir, hal ini bertujuan untuk membersihkan kotoran yang melekat pada daun. Kemudian dilakukan perajangan dan pengeringan dalam suhu ruangan yaitu 20°-25°C yang bertujuan untuk mengurangi kadar air yang terdapat dalam sampel. Setelah sampel kering lalu dihaluskan sampai menjadi serbuk menggunakan blender kemudian disimpan dalam wadah tertutup baik untuk perlakuan selanjutnya.

3.6.3 Ekstraksi

Pembuatan ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoeae carnea*) dilakukan dengan metode maserasi yaitu dengan cara merajang, menimbang kemudian mengekstraksi dengan pelarut Etanol, Etil Asetat dan N-Heksan dengan menggunakan maserator.

- a. Pelarut n-heksan dituangkan kedalam maserator secara pelan-pelan, kemudian biarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia lalu diaduk. Setelah itu lakukan remaserasi selama 4-5 hari, kemudian hasil filtratnya diambil dan masukan kedalam wadah baru hingga diperoleh ekstrak cair. Hasil filtrat ekstrak cair tersebut kemudian dipekatkan menggunakan rotatory evaporator sampai menghasilkan ekstrak kental.
- b. Pelarut etil asetat dituangkan kedalam maserator secara pelan-pelan, kemudian biarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia lalu diaduk. Setelah itu lakukan remaserasi selama 4-5 hari, kemudian hasil filtratnya

diambil dan masukan kedalam wadah baru hinga diperoleh ekstrak cair. Hasil filtrat ekstrak cair tersebut kemudian dipekatkan menggunakan rotatory evaporator sampai menghasilkan ekstrak kental.

- c. Pelarut etanol dituangkan kedalam maserator secara pelan-pelan, kemudian biarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia lalu diaduk. Setelah itu lakukan remaserasi selama 4-5 hari, kemudian hasil filtratnya diambil dan masukan kedalam wadah baru hinga diperoleh ekstrak cair. Hasil filtrat ekstrak cair tersebut kemudian dipekatkan menggunakan rotatory evaporator sampai menghasilkan ekstrak kental.

3.6.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi dan mengetahui senyawa kimia yang terkandung didalam simplisia maupun ekstrak daun kangkung pagar, skrining fitokimia yang dilakukan yaitu uji alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, polifenol dan steroid. Langkah pemeriksaan skiring fitokimia sebagai berikut (Harbone, 2006):

1. Pemeriksaan alkaloid

4 gram sampel ditambahkan 10 ml ammonia, kemudian larutan tersebut disaring kedalam tabung reaksi dan filtrate ditambahkan 10 tetes H_2SO_4 2N. Campuran dikocok dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas dipindahkan kedalam tabung reaksi masing-masing diisi kurang lebih 1 ml. Kemudian tambahkan perekasi mayer, jika didapatkan endapan putih tandanya mengidentifikasi adanya alkaloid didalam sampel .

2. Pemeriksaan Flavonoid

Sampel diektrak menggunakan methanol lalu dipanaskan dalam tabung reaksi. Kemudian tabung reaksi ditambahkan serbuk mg dan asam klorida pekat. Jika hasil reaksi menunjukkan warna merah muda berarti menunjukkan adanya kandungan flavonoid dalam sampel.

3. Pemeriksaan Saponin

2 gram sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan aquadest, kemudian tabung reaksi dikocok kuat. Jika teramati adanya buih yang stabil pada tabung reaksi, maka adanya saponin dalam sampel.

4. Pemeriksaan Tanin dan Fenolik

Sampel yang sudah dirajang halus diekstrak dengan methanol dalam tabung reaksi, kemudian hasil ekstrak tersebut ditetesi 2-3 tetes larutan $FeCl_3$ 1% lalu diamati. Jika teramati warna biru kehijauan maka menunjukkan adanya tannin dalam sampel dan jika berwarna hijau kekuningan maka menunjukkan adanya fenolik dalam sampel.

5. Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Sari dari simplisia kemudian di eter, diuapkan dan ditetaskan pereaksi Liberman Buchard, sehingga membentuk warna keunguan menunjukkan positif terpenoid dan sedangkan warna biru-hijau positif steroid.

3.6.5 Penyiapan Larutan

a. Pengenceran Ekstrak

Sejumlah milligram ekstrak (n-heksana, etil asetat, etanol) daun kangkung pagar ditimbang, masukkan dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan etanol pa 96% sampai tanda batas (100ppm). Kemudian dipipet dari larutan induk yang dibuat sesuai dengan variasi konsentrasi ekstrak (n-heksana, etil asetat, etanol) batang kangkung pagar yang masing-masing ditambahkan beberapa ml etanol pa 96% sampai tanda batas pada labu takar. (Widyastuti, 2010).

b. Pembuatan Larutan Uji Torolox

Larutan induk standar baku Torolox ® dibuat konsentrasi 50 ppm sebagai control positif. Torolox ® ditimbang 2,5 mg, masukkan dalam labu ukur 50 ml, larutkan dengan etanol pa 96% sampai tanda batas (50ppm). (Widyastuti, 2010)

3.7 Uji Aktivitas Antioksidan Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

3.7.1 Pembuatan Larutan Stok FRAP (Widyastuti, 2010)

a. Larutan Buffer Asetat 300mM (PH 3,6)

Natrium asetat trihidrat 0,3875 g ditambahkan dengan 2 mL asam asetat pekat kemudian dilarutkan dengan aquadest sampai 100 mL dalam labu ukur.

b. Larutan 2,4,6-*tripiryridyl-striazine* (TPTZ) 10 mM.

Sebanyak 31 mg TPTZ ditimbangdan kemudian dilarutkan dalam 10 mL HCl 40 mmol/L.

c. Larutan FeCl₃.6H₂O 20 mM

FeCl₃.6H₂O sebanyak 270 mg dilarutkan sampai 50 mL aquadest pada labu ukur.

d. Pembuatan Reagen FRAP

Bahan buffer asetat 25 mL, larutan TPTZ 2,5 mL, dan larutan FeCl₃.6H₂O 2,5 mL dicampurkan, dengan perbandingan 10:1:1 hingga homogen dan ditambahkan aquadest sampai 100 mL pada labu ukur.

3.7.2 Pengujian Antioksidan Larutan Uji Dengan Metode FRAP (Widyastuti, 2010) Sampel dilarutkan dalam etanol pa 96% dengan konsentrasi 100 µg/mL,

Lalu ditambahkan dengan Larutan FRAP dengan konsentrasi 100 µg/mL, dengan perbandingan 1:3. Kemudian larutan tersebut diinkubasi selama 30 menit dengan keadaan terlindungi dari cahaya pada suhu 37° C. Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada Panjang gelombang 593 nm. Kurva kalibrasi disiapkan dengan deret standar Torolox. Kapasitas antioksidan dinyatakan sebagai berat setara dengan Torolox ® tiap gram sampel (ekstrak). Perhitungan total antioksidan dilakukan dengan persamaan regresi linear: $y = b x + a$.

Keterangan:

y = Absorbansi sampel

x = kadar antioksidan sampel (mg AAE/L)

b = Slope dari kurva standar

a = intersep dari kurva standar

$$\text{Kapasitas antioksidan (mgTr/g Ekstrak)} = \frac{C \times V \times Fp}{\text{bobot awal sampel}}$$

Keterangan:

C = konsentrasi sampel atau nilai x (mg AAE/L)

V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)

Fp = Faktor pengenceran

g = berat sampel yang digunakan (gram)

Aktivitas antioksidan diukur sebagai persen kapasitas FRAP dengan rumus perhitungan:

$$\% \text{ Kapasitas} = 100\% - \%T$$

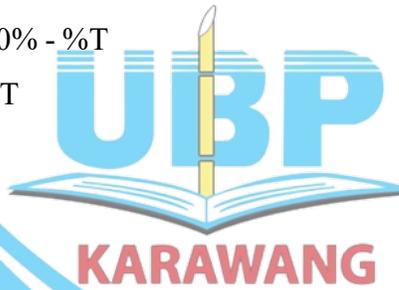
dimana: $A = -\log T$

$$\% T = T \times 100\%$$

Keterangan :

T = Transmitan

A = Absorbansi sampel setelah penambahan FRAP



3.8 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

3.8.1 Pembuatan larutan stok DPPH (Fitriyani, At all 2017)

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 0,1577 gr lalu dilarutkan dengan Etanol PA hingga 100 ml dalam labu ukur, maka diperoleh larutan dengan konsentrasi 0.4 mM.

3.8.2 Pengukuran Serapan Larutan Blanko DPPH

Larutan DPPH dipipet sebanyak 1 ml ditambahkan 4 ml etanol p.a dimasukkan kedalam vial kemudian larutan ini diukur dengan spektrofotometri UV Vis pada Panjang gelombang maksimum.

3.8.3 Pengujian Antioksidan Larutan Uji dengan Metode DPPH

Larutan seri konsentrasi dipipet masing-masing 1 ml dan ditambahkan larutan 0.4 mM DPPH 1ml. Larutan tersebut kemudian dicukupkan dengan etanol hingga 5 ml kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit ditempat yang gelap. Serapan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 516-520 nm.

3.9 Penentuan Nilai EC₅₀

Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana, etanol dan etil asetat daun kangkung pagar dengan metode peredaman radikal bebas FRAP dihitung dengan cara menentukan *Effective concentracion* (EC₅₀).

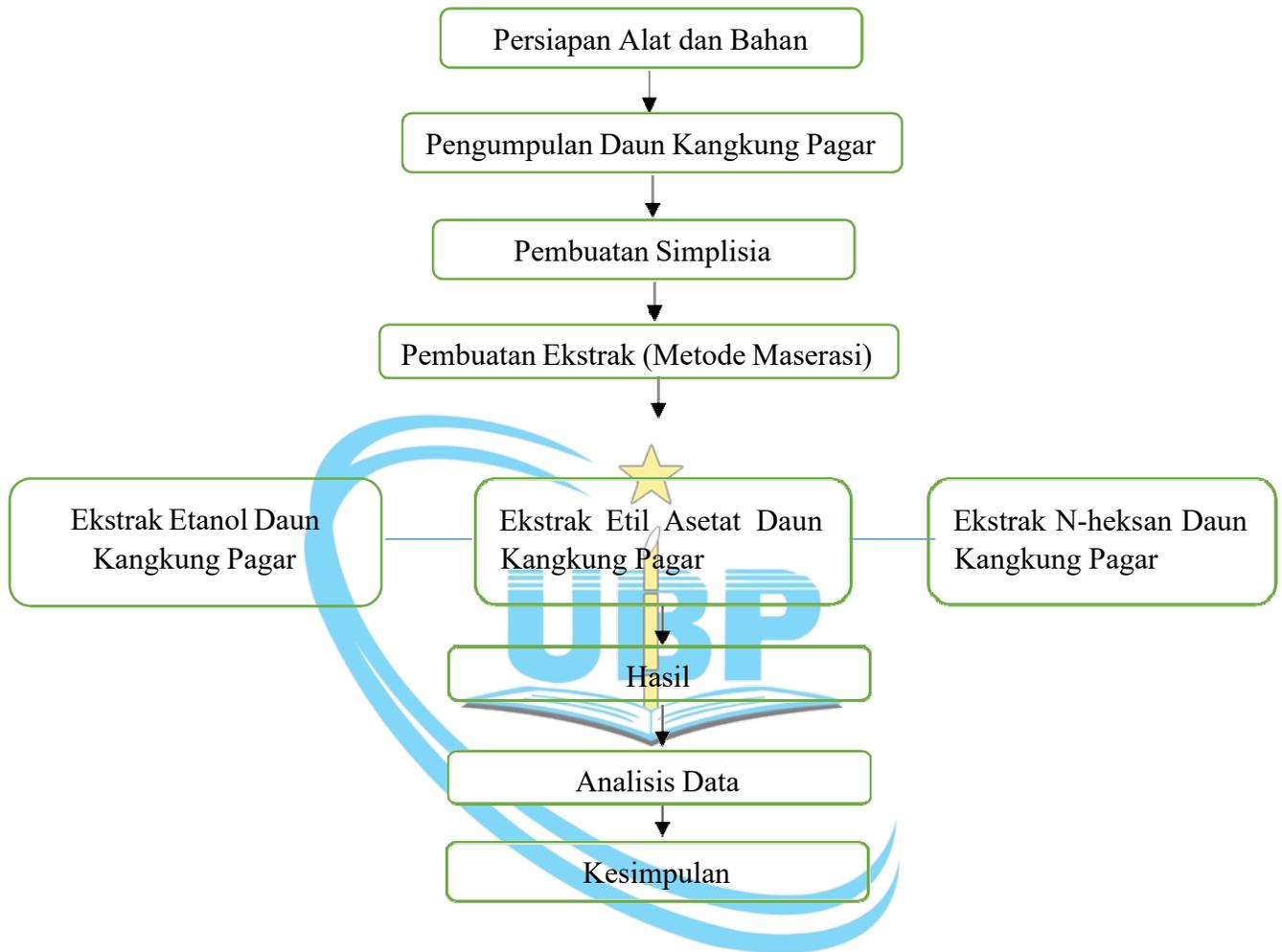
Untuk menentukan nilai EC₅₀, pertama-tama tentukan persen perendaman, kemudian tentukan nilai probit untuk setiap persen perendaman, dan terakhir dapatkan persamaan regresi linier dari hubungan antara konsentrasi logaritmik masing-masing ekstrak dengan setiap nilai probit ($y = ax + b$). Nilai EC₅₀ mewakili konsentrasi larutan sampel yang diperlukan untuk menghambat radikal bebas sebesar 50% dengan demikian mewakili aktivitas antioksidan larutan.

Antioksidan sangat kuat apabila nilai dari EC₅₀ < 50 µg/ml, kuat apabila nilai dari EC₅₀ 50-100 µg/ml, sedang apabila nilai dari EC₅₀ 100-150 µg/ml, dan lemah apabila nilai dari EC₅₀ 151-200 µg/ml (Thonahi *et.al.*, 2014).

Tabel 3.1 Tingkat kekuatan antioksidan (Thonahi *et.al.*, 2014) :

Intensitas	Nilai EC ₅₀
Sangat Kuat	< 50 µg/ml
Kuat	50-100 µg/ml
Sedang	100-150 µg/ml
Lemah	151-200 µg/ml

3.10 Kerangka Penelitian



3.11 Jadwal Kegiatan

Kegiatan	Bulan Penelitian					
	April	Mei	Juni	Juli	Agustus	September
Stadi literature	■	■	■	■	■	■
Penulisan proposal	■	■				
Seminar proposal		■				
Pelaksanaan penelitian			■	■		
Pengolahan dan analisis data			■	■	■	
Penulisan tugas akhir				■	■	■
Sidang tugas akhir						■

