

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan bulan Agustus 2019.

3.2 Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-VIS (*Thermo Scientific* 33-PPPTS2017-L205-0006), Neraca Analitik (*ae-ADAM*), *Centrifuge* PLC-025, incubator 601 *MERCK* (*Gemmyco*), *Rotary Evaporator* (*EYELA* OSB-2100-CE), *water bath*, micro pipet, Vial coklat 10 ml dan alat-alat yang lazim digunakan dilaboratorium.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga genjer, n-heksan, etil asetat, metanol p.a, etanol p.a, ammonia, kloroform, Amil alkohol, untuk identifikasi flavonoid dan besi (III) flourida (FeCl 0,1%), Kalium dihydrogen phospat (KH_2SO_4), Potassium Hexacyanoferrate (III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Natrium hidroksida (NaOH), 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*), Etanol p.a, tricchloroacetic acid (TCA), kertas saring dan alumunium foil.

3.3. Pembuatan Simplisia

Pembuatan ekstrak bunga genjer dilakukan dengan metode maserasi, yaitu bunga genjer dirajang, kemudian ditimbang, lalu diekstraksi dengan menggunakan pelarut n-hexan, etil asetat dan metanol dengan cara maserasi. Masukkan Sample bunga genjer ke dalam maserator.

1. Pelarut n-hexan dituang secara perlahan ke dalam maserator. Setelahnya, dibiarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia yang sesekali

dilakukan pengadukan, lalu dilakukan remaserasi selama empat hari hingga bening. Selanjutnya, disaring ke dalam wadah baru sehingga diperoleh ekstrak cair. Hasil penyarian dari ekstrak diuapkan menggunakan evaporator di bawah titik didih sampai diperoleh ekstrak kental.

2. Pelarut etil asetat dituang secara perlahan ke dalam maserator. Setelahnya, dibiarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia yang sesekali dilakukan pengadukan, lalu dilakukan remaserasi selama empat hari hingga bening. Selanjutnya, disaring ke dalam wadah baru sehingga diperoleh ekstrak cair. Hasil penyarian dari ekstrak diuapkan menggunakan evaporator di bawah titik didih sampai diperoleh ekstrak kental.
3. Pelarut metanol dituangkan secara perlahan ke dalam maserator. Setelahnya, dibiarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia yang sesekali dilakukan pengadukan, lalu dilakukan remaserasi selama empat hari hingga bening. Selanjutnya, disaring ke dalam wadah baru sehingga diperoleh ekstrak cair. Hasil penyarian dari ekstrak diuapkan menggunakan evaporator di bawah titik didih sampai diperoleh ekstrak kental.

$$\% \text{rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{berat simplisia yang diekstrak (g)}} \times 100$$

3.4. Skrining Fitokimia

1. Skrining fitokimia terhadap simplisia bunga genjer meliputi:

- a. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram serbuk simplisia ditambahkan 1 ml HCl 2N dan 9 ml air suling. Lalu dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Kemudian filtrat dibagi ke dalam 2 tabung reaksi. Pada tabung pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan merah bata. Pada tabung kedua ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau kuning (Harborne, 1987).

- b. Uji Flavanoid

Sebanyak 2 g serbuk simplisia ditambahkan NaOH 10%, tunggu beberapa saat, apabila terbentuk warna kuning, orange atau merah, menunjukkan bahwa adanya flavonoid (Harborne, 1987).

c. Uji Fenolik

Sampel sebanyak 1 ml ditambah 10 tetes FeCl_3 1%. Hasil positif adanya senyawa fenolik adalah terbentuknya warna merah, biru, ungu, hitam atau hijau (Harborne, 1987).

d. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan melarutkan sampel dalam aquadest kemudian dipanaskan selama 15 menit lalu dikocok selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang stabil selama kurang lebih 10 menit dan tidak hilang saat ditambahkan beberapa tetes asam klorida 2N, maka sampel positif mengandung saponin (Harborne, 1987).

e. Uji Tanin

Uji fitokimia tanin dilakukan dengan penambahan larutan gelatin dalam ekstrak. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih (Mabrurroh, 2015). Sebanyak 3 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 5 tetes larutan gelatin, jika terbentuk endapan putih maka positif mengandung tanin (Kusumaningsih, 2015).

f. Uji Kuinon

Filtrat hasil pemanasan dengan aquadest dimasukan kedalam tabung reaksi ditambahkan NaOH, adanya warna kuning tua, jingga menunjukan positif Kuinon (Harborne, 1987).

2. Skrining fitokimia terhadap ekstrak bunga genjer meliputi:

a. Uji Alkaloid

Ekstrak sebanyak 1 ml ditambah 2 ml HCl 2N dan dikocok. Campuran selanjutnya dibagi dalam 2 tabung berbeda. Masingmasing tabung ditetesi 1 tetes reagen Dragendorff pada tabung pertama, pada tabung kedua ditetesi 1 tetes reagen Mayer. Adanya senyawa alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan kuning pada penambahan

reagen Mayer dan terbentuknya endapan merah pada penambahan reagen Dragendorff (Tiwari *et al.* 2011)

b. Uji Flavonoid

Ekstrak sebanyak 1 ml ditambahkan serbuk magnesium secukupnya dan 10 tetes asam klorida pekat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna hitam kemerahan, kuning atau jingga.

c. Uji Fenolik

Ekstrak sebanyak 1 ml ditambah 10 tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif adanya senyawa fenolik adalah terbentuknya warna merah, biru, ungu, hitam atau hijau (Harborne 1987).

d. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan melarutkan sampel dalam aquadest kemudian dipanaskan selama 15 menit lalu dikocok selama 15 10 detik. Jika terbentuk buih yang stabil selama kurang lebih 10 menit dan tidak hilang saat ditambahkan beberapa tetes asam klorida 2N, maka sampel positif mengandung saponin (Harborne, 1987).

e. Uji Tanin

Uji fitokimia tanin dilakukan dengan penambahan larutan gelatin dalam ekstrak. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih. Sebanyak 3 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 5 tetes larutan gelatin, jika terbentuk endapan putih maka positif mengandung tanin (Kusumaningsih, 2015).

f. Uji Kuinon

Ektrak bunga genjer dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan peraksi NaOH, jika terbentuk larutan warna kuning tua, jingga atau merah maka positif mengandung Kuinon (Harborne, 1987).

3.5. Uji Antioksidan Dengan Metode DPPH

Metode DPPH adalah metode uji aktivitas antioksidan yang sederhana, mudah, cepat dan peka, serta hanya menggunakan sedikit sampel. DPPH merupakan senyawa radikal bebas stabil kelompok nitrit oksida. Senyawa ini mempunyai ciri-ciri padatan berwarna ungu kehitaman, larut

dalam pelarut etanol atau methanol (Prakash, 2001). Backer (1999) menyatakan bahwa aktivitas antioksidan suatu senyawa dapat diukur dari kemampuannya menangkap radikal bebas. Radikal bebas yang biasa digunakan sebagai model dalam mengukur daya penangkapan radikal bebas yaitu DPPH yang merupakan senyawa radikal bebas yang stabil sehingga apabila digunakan sebagai pereaksi dalam uji penangkapan radikal bebas cukup dilarutkan. Jika disimpan dalam keadaan kering dengan kondisi penyimpanan yang baik akan stabil selama bertahun-tahun (Amelia, 2011).

Metode DPPH merupakan metode paling sering digunakan untuk penyaringan aktivitas antioksidan dari berbagai tanaman obat. Metode peredaman radikal bebas DPPH didasarkan pada reduksi dari radikal bebas DPPH yang berwarna oleh penghambat radikal bebas (Shivaprasad., 2005).

Prosedur ini melibatkan pengukuran penurunan serapan DPPH pada panjang gelombang maksimalnya, yang sebanding terhadap konsentrasi penghambat radikal bebas yang ditambahkan ke larutan reagen DPPH. Aktivitas tersebut dinyatakan sebagai konsentrasi efektif, IC50 atau (*inhibitory concentration*) (Amelia, 2011).

1. Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH dengan konsentrasi 50 ppm dibuat dengan cara menimbang DPPH sebanyak 5mg lalu dilarutkan dengan 100ml metanol p.a dalam labu ukur lalu diamkan selama 30 menit (Williams, 1995).

2. Pembuatan Larutan Sampel

Larutan sampel dibuat dengan konsentrasi 31,25 ppm, 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm dan 500 ppm, dibuat dengan cara menimbang ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol bunga genjer (*Limnocharis flava* L) sebanyak 5mg dan dilarutkan dengan metanol p.a sambil dikocok lalu di tambahkan larutan metanol add 100 ml dalam labu ukur (Williams, 1995).

3. Pembuatan Larutan Pembanding

Larutan pembanding dibuat dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm dan 8 ppm dan 10 dengan cara menimbang vitamin C sebanyak 5 mg dan dilarutkan dalam metanol p.a sambil dikocok lalu di tambahkan larutan metanol p.a add 100 ml dalam labu ukur (Williams, 1995).

3.6. Uji Antioksidan Dengan Metode FRAP

Metode ini dapat menentukan kandungan antioksidan total dari suatu bahan berdasarkan kemampuan mereduksi ion Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} sehingga kekuatan antioksidan suatu senyawa dianalogkan dengan kemampuan mereduksi dari senyawa tersebut (Halvorsen, *et al.*, 2002). Sebanyak 2 ml ekstrak (n-heksan, etil asetat dan metanol) berbagai konsentrasi (50, 100, 200, 400, 800 dan 1000 ppm) dalam etanol p.a 2 ditambahkan 2 ml buffer pospat 0,2 M, pH =6,6 ditambahkan 2 ml $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ sebesar 1%, campuran tersebut diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit, selanjutnya ditambahkan 2 ml trichloroacetic acid (TCA) 10% untuk menghentikan reaksi (apabila terjadi dua lapisan, dipisahkan melalui sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit), lapisan atas diambil sebanyak 2 ml, kemudian ditambahkan dengan aquabides, 0,5 ml FeCl_3 0,1%. Campuran larutan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar (25°C) selama 5-10 menit. Serapan larutan tersebut kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 539 nm. absorbansi sebagai indikator peningkatan daya mereduksi, sebagai pembanding mereduksi sample digunakan Vitamin C.

1. Pembuatan Larutan Dapar Fosfat 0,2 M PH 6,6

Timbang 0,2 gram NaOH dan dilarutkan dengan air bebas CO_2 hingga 25 ml dalam labu ukur, kemudian timbang KH_2PO_4 sebanyak 1,360 gram dan dilarutkan dengan air bebas CO_2 hingga 50 ml dalam labu ukur. Kemudian dipipet sebanyak 16,4 ml NaOH, dimasukan dalam labu ukur dan di campurkan 50 ml KH_2PO_4 , selanjutnya diukur sampai pH 6,6 dan dicukupkan dengan air bebas CO_2 hingga 200 ml.

2. Larutan Kalium Ferrisianida 1%

Timbang 1 gram kalium ferrisianida dan dilarutkan dengan air bebas CO_2 100 ml dalam labu ukur.

3. Larutan FeCl_3 0,1%

Timbang 0,1 gram FeCl_3 dan dilarutkan dengan air bebas CO_2 hingga 100 ml dalam labu ukur.

4. Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10%

Timbang 10 gram TCA dan dilarutkan dengan air bebas CO₂ hingga 100 ml dalam labu ukur.

A. Uji aktivitas antioksidan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

1) Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Sebanyak 2 ml ekstrak (n-heksan, metanol dan etil asetat) berbagai konsentrasi (50, 100, 200, 400, 800 dan 1000 ppm) dalam etanol p.a ditambahkan 2 ml buffer pospat 0,2 M, pH =6,6 ditambahkan 2 ml K₃Fe(CN)₆ sebesar 1%, campuran tersebut diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit, selanjutnya ditambahkan 2 ml *trichloroacetic acid* (TCA) 10% untuk menghentikan reaksi (apabila terjadi dua lapisan, dipisahkan melalui sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit), lapisan atas diambil sebanyak 2 ml, kemudian ditambahkan dengan aquabides, 0,5 ml FeCl₃ 0,1%. Campurkan larutan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar (25°C) selama 5-10 menit. Serapan larutan tersebut kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 539 nm.

2) Pembuatan Larutan vitamin C Sebagai Pembanding

Sebanyak 2 ml Vitamin C berbagai konsentrasi (50, 100, 200, 400, 800 dan 1000 ppm) dalam etanol p.a ditambahkan 2 ml buffer pospat 0,2 M, pH =6,6 ditambahkan 2 ml K₃Fe(CN)₆ sebesar 1%, campuran tersebut diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit, selanjutnya ditambahkan 2 ml *trichloroacetic acid* (TCA) 10% untuk menghentikan reaksi (apabila terjadi dua lapisan, dipisahkan melalui sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit), lapisan atas diambil sebanyak 2 ml, kemudian ditambahkan dengan aquabides, 0,5 ml FeCl₃ 0,1%. Campurkan larutan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar (25°C) selama 5-10 menit. Serapan larutan tersebut kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 539 nm.