

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk menguji aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi n-heksan, etil atsetat dengan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), uji fenolik total dan flavonoid total ekstrak etanol kulit batang jambang menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini sudah dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang dari bulan Februari hingga Agustus 2024.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit batang jambang, sedangkan sampel penelitian ini merupakan ekstrak etanol 70% batang kulit jambang yang dilakukan proses pembuatan simplisia dan ekstraksi maserasi. Tumbuhan kulit batang jambang berasal dari Kecamatan Banyusari, Kabupaten Karawang, Provinsi Jawa Barat

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu alat maserator, *rotary evaporator* (*eyela*), spektrofotometer UV-Vis (*themo insight*), corong pisah 500mL (*pyrex*), vial, blender, corong Buncher, timbangan analitik, mikropipet, kuvet, kurs porselin.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit batang jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), Etanol 70%, DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) (*Sigma*), vitamin C, n-heksan, etil asetat, aquadest, kloroform, pereaksi dragendorf, pereaksi mayer, pereaksi besi (III) klorida, pereaksi kalium hidroksida, HCl 2N, gelatin 1%, KOH 5%, H₂SO₄, FeCl₃ 1%, asam asetat 0,7%, Asam Galat, Na₂CO₃, Natrium Asetat, Kuersetin, AlCl₃

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Klasifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Varibel bebas dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol dan fraksi kulit batang jambang (*Syzygium cumini* (L) Skeels)

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu Standarisasi simplisia, skrining fitokimia, fenolik total, flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi kulit batang jambang (*Syzygium cumini* (L) Skeels)

3.5.2 Variabel Operasional

Berkut ini definisi variable operasional yang terdapat pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

Tabel 3. 1 Definisi Variabel Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Rasio
Variabel Bebas				
Ekstrak Etanol Kulit Batang Jamblang	Ekstrak etanol kulit batang jamblang adalah ekstrak kental yang terbuat dari kulit batang jamblang yang sudah dikeringkan dan diekstraksi dengan etanol 70% untuk memperoleh rendemen ekstrak	Observasi	Nominal	%
Variabel Terikat				
Skrining Fitokimia	Ekstrak yang sudah dimaserasi kemudian di uji dengan reagen pendeteksi golongan senyawa seperti flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, dan lain-lain	Observasi	indikator	-
Uji Antioksidan	Memipet dari masing-masing larutan uji ekstrak Kemudian ditambahkan dengan larutan DPPH, selanjutnya dilakukan inkubasi dan Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum.	Spektrofotometer Uv-Vis	Nominal	%

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan Laboratorium Taksonomi, jurusan Biologi, Fakultas MIPA UNPAD dengan membawa semua bagian dari tumbuhan. Tujuan dari determinasi adalah untuk memastikan bahwa tumbuhan tersebut benar-benar spesies dari (*Syzygium cumini* (L.) Skeels).

3.6.2 Penyiapan Simplisia

Sampel tanaman kulit batang jambang diambil dari kecamatan Banyusari Kabupaten Karawang. Kemudian tanaman tersebut disortasi basah, dibersihkan dengan air mengalir. Setelah itu dirajang (dipotong kecil-kecil) lalu dilakukan penjemuran dibawah sinar matahari menggunakan kain hitam, selanjutnya disortasi kering. Simplisia kering dari kulit batang jambang disimpan dalam wadah yang kedap udara.

3.6.3 Standarisasi Simplisia

a. Parameter Non Spesifik

1) Kadar Abu

Sebanyak 2 gram simplisia dipijarkan pada suhu 550°C dalam tanur selama 3 jam, didinginkan dan ditimbang. Kemudian dihitung kadar abunya sesuai persamaan tersebut (Wijanarko *et al.*, 2020).

Rumus :

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan :

- W₀ : Berat kurs kosong
- W₁ : Berat kurs + sampel sebelum dioven
- W₂ : Berat kurs + sampel setelah dioven

2) Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu hasil kadar abu total dididihkan selama lima menit dalam 25 mL asam klorida encer. Bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan dengan kertas saring bebas abu dan dicuci dengan air panas. Kemudian dipijarkan pada suhu 450°C dalam tanur selama 15 menit hingga diperoleh berat konstan dan dihitung kandungannya (Wijanarko *et al.*, 2020):

$$\text{Kadar Abu Tidak Larut Asam (\%)} = \frac{\text{Berat abu tidak larut asam}}{\text{Berat simplisia awal}} \times 100\%$$

3) Kadar Air

Sebanyak 2 g simplisia dikeringkan selama 5 jam dengan suhu 105°C dalam oven dan ditimbang kembali. Kemudian dikeringkan kembali dan ditimbang dengan rentang 1 jam sampai diperoleh bobot tetap dan dihitung kadar airnya sesuai persamaan (Wijanarko *et al.*, 2020)

Rumus :

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan :

W_0 : Berat kurs kosong

W_1 : Berat kurs + sampel sebelum dioven

W_2 : Berat kurs + sampel setelah dioven

b. Parameter Spesifik

1) Kadar Sari Larut Air

Sebanyak 5 g simplisia yang telah ditambahkan 100 ml air-kloroform (campuran 2,5 ml kloroform dan 1 liter air) distirer selama dalam Erlenmeyer selama 6 jam. Selanjutnya campuran tersebut diamkan dan disaring. Kemudian dievaporasi 20 ml filtrat pada suhu 105°C hingga diperoleh bobot konstan dan dihitung kadarnya sesuai persamaan (Depkes RI, 2017).

Rumus :

$$\text{Kadar Sari Larut Air (\%)} = \frac{\text{Bobot sari larut Air}}{\text{Berat simplisia}} \times \frac{\text{Vol. pelarut}}{\text{Vol. filtrat}} \times 100\%$$

2) Kadar Sari Larut Etanol

Sebanyak 5 gram simplisia ditambahkan etanol 100 mL kemudian direndam selama 24 jam dan disaring. Sebanyak 20 ml filtrat dievaporasi pada suhu 105°C hingga diperoleh bobot tetap dan dihitung kadarnya sesuai persamaan 2 (Depkes RI, 2017).

Rumus :

$$\text{Kadar Sari Larut Etanol (\%)} = \frac{\text{Bobot sari larut Etanol}}{\text{Berat simplisia}} \times \frac{\text{Vol. pelarut}}{\text{Vol. filtrat}} \times 100\%$$

3.6.4 Pembuatan Ekstrak

Proses ekstraksi kulit batang jambang dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan etanol 70% sebagai pelarutnya. Simplisia kulit batang seberat 2000 gram dihancurkan menjadi serbuk dengan menggunakan blender. Selanjutnya, serbuk simplisia direndam dengan pelarut etanol 70%. Maserasi dilakukan selama tiga kali 24 jam, dengan mengganti pelarut yang sama setiap 24 jam. Ekstrak selanjutnya disaring menggunakan corong Buncher dan filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental (Nugroho, 2021)

Rendemen yang diperoleh dihitung dan dicatat :

$$\% \text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat Ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Berat simpisia awal yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

3.6.5 Skrining Fitokimia

Uji skrining fitokimia merupakan suatu metode penapisan kimia terhadap kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, polifenol, kuinon, steroid, terpenoid dan saponin yang terkandung dalam kulit batang jambang.

1. Uji Alkaloid

Sebanyak 2 ml larutan uji diuapkan diatas cawan porselen. Residu yang terbentuk dilarutkan dengan 5 ml HCl 2N. Larutan yang dihasilkan ditambahkan dengan pereaksi Mayer. Positif alkaloid jika menghasilkan warna kuning dan endapan jingga ketika ditambahkan reagen Dragendroff (Puspitasari *et al.*, 2013).

2. Uji Flavonoid

Sebanyak 3 ml larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan $MgSO_4$ dan 5 tetes HCl pekat. Positif mengandung flavonoid jika menghasilkan warna kuning, orange dan merah (Nafisah *et al.*, 2014).

3. Uji Tanin

Ekstrak 0,1 gram dalam cawan ditambahkan 2 mL etanol kemudian diaduk, ditambahkan $FeCl_3$ sebanyak 3 tetes, jika menghasilkan biru karakteristik, biru-hitam, hijau atau biru-hijau dan endapan kehijauan (Sami *et al.*, 2016)

4. Uji Saponin

Ekstrak 0,1 gram dalam tabung reaksi ditambahkan 2 mL etanol kemudian diaduk, ditambahkan dengan 10 mL aquadest dan dikocok kemudian didiamkan selama 15-20 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya busa (Sami *et al.*, 2016)

5. Uji Terpenoid dan Steroid

Sebanyak 0,5 gram sampel uji ditambahkan liberman sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Adanya steroid ditunjukkan oleh warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu.

3.6.6 Penentuan Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Kulit Batang

Jamblang

a. Pembuatan Kurva Standar Asam Galat

Larutan induk asam galat 0,05% dibuat dengan cara melarutkan 50 mg asam galat dalam 0,5 mL etanol p.a lalu diencerkan akuades labu ukur 100 mL hingga batas tanda. Dibuat seri konsentrasi larutan standar asam galat 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm dengan cara dipipet sejumlah volume dari larutan sampel ke dalam labu ukur 10 mL kemudian diencerkan dengan akuades hingga batas tanda. Sebanyak 300 μ L masing-masing larutan diambil dan ditambahkan 1,5 mL *Folin Ciocalteu*, larutan digojog hingga homogen kemudian larutan didiamkan selama operating time yaitu 47 menit pada suhu ruangan, lalu dibaca serapannya pada panjang gelombang 770 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

b. Penetapan Kadar Fenolik Total

Sebanyak 10 mg ekstrak ditimbang lalu dilarutkan dalam 10 mL akuades. Sebanyak 300 μ L larutan sampel ditambah 1,5 mL *Folin Ciocalteu*, larutan dikocok hingga homogen, kemudian larutan didiamkan selama waktu operasi 47 menit pada suhu ruang, kemudian larutan didiamkan selama 47 menit pada suhu ruang. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 770 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. . Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali. Kadar total fenolik dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier dari asam galat. $y = ax + b$.

$$Fenol\ Total = \frac{Cp \times V \times Fp}{M}$$

Keterangan :

Cp = Konsentrasi Fenolik (μ g GAE/mL)

V = Volume Larutan (mL)

Fp = Faktor Pengenceran (bila ada)

M = Berat Sampel (gram)

3.6.7 Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Batang Jamblang

a. Pembuatan Kurva Standar Kuersetin

Larutan induk kuersetin 100 ppm dibuat dengan cara menimbang 50 mg kuersetin, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, ditambahkan akuades hingga batas tanda, lalu kocok hingga homogen. Seri konsentrasi larutan standar kuersetin dibuat dengan sejumlah volume dipipet dari larutan induk lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan pelarut etanol p.a hingga tanda sehingga terdapat standar dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Sebanyak 0,5 mL larutan standar dari masing-masing konsentrasi dipipet, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,1 mL aluminium klorida 10%, 0,1 mL natrium asetat 1M, dan 2,8 mL akuades kemudian diinkubasi selama 30 menit, lalu dibaca serapannya pada panjang gelombang 440 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

b. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Sebanyak 20 mg ekstrak kental ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a dalam tabung reaksi kemudian disentrifugasi sehingga diperoleh konsentrasi sampel 2000 ppm. Sebanyak 0,5 mL larutan standar dari masing-masing labu ukur ditambahkan 0,1 mL aluminium klorida 10% 0,1 mL natrium asetat 1M dan 2,8 mL akuades kemudian diinkubasi selama 30 menit, lalu dibaca serapannya pada panjang gelombang 440 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali

$$\text{Flavonoid Total} = \frac{Ca \times V \times Fp}{M}$$

Keterangan :

Cp = Konsentrasi Flavonoid ((μ g QE/mL)

V = Volume Larutan (mL)

Fp = Faktor Pengenceran (bila ada)

M = Berat Sampel (gram)

3.6.8 Fraksinasi

Fraksinasi ekstrak dilakukan secara partisi dengan menggunakan campuran dua pelarut yang memiliki kepolaran yang berbeda yaitu dengan menggunakan metode fraksinasi cair-cair. Campuran pelarut pertama adalah campuran n-heksan : air dan yang kedua adalah campuran etil asetat : air. Pertama, Ekstak etanol dengan berat tertentu dilarutkan dalam air dengan volume tertentu sehingga ekstrak terlarut semuanya, kemudian n-heksan dengan volume tertentu ditambahkan untuk melarutkan ekstrak yang terlarut dalam pelarut non polar. Campuran tersebut dimasukkan kedalam corong pisah dan dikocok kuat-kuat hingga diperoleh lapisan air dan lapisan n-heksan, kedua lapisan kemudian dipisahkan. Kedalam lapisan air, selanjutnya ditambahkan etil asetat dan campuran tersebut dikocok kuat-kuat sehingga diperoleh lapisan air dan lapisan etil asetat, dan kedua lapisan tersebut dipisahkan. Lapisan n-heksan, lapisan air dan lapisan etil asetat kemudian diuapkan dalam rotary evaporator hingga diperoleh fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air (Najihudin, 2017).

3.6.9 Uji Antioksidan dengan Metode DPPH

Berikut Pengujian Antioksidan menggunakan metode DPPH :

1. Pembuatan larutan DPPH

Kristal DPPH 100 ppm sebanyak 25 mg dilarutkan dalam etanol sebanyak 25 mL. Larutan DPPH dijaga dalam temperatur rendah dan terlindung cahaya.

2. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan DPPH 100 ppm ditambahkan ke dalam botol coklat dan ditambahkan dengan metanol p.a sebanyak 2 mL, diinkubasi selama 30 menit.

3. Penentuan Panjang Gelombang

Larutan DPPH sebanyak 1 ml diencerkan dengan etanol sampai tanda batas labu takar 5 mL, blanko digunakan 5 mL etanol, diukur pada panjang gelombang 500-530 nm untuk mendapatkan absorbansi $\pm 0,2-0,8$.

4. Penentuan Serapan Absorbansi

Larutan DPPH 2 mililiter dimasukkan ke botol coklat dan ditambahkan dengan etanol p.a sebanyak 2 mililiter, diinkubasi selama 30 menit suhu 37°C , lalu diukur serapan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Perlakuan dilakukan di ruangan yang tertutup dan terhindar dari cahaya, serta pengerjaan dilakukan secara triplo.

5. Pembuatan Vitamin C

Vitamin C dibuat larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan stok 1000 ppm dibuat larutan standar 2, 4, 6, 8, 10, 12 ppm.

6. Pembuatan Larutan Ekstraksi Etanol dan Fraksi Kulit Batang Jamblang

Ekstrak Etanol dan fraksi kulit batang jamblang dibuat larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm dengan mengukur ekstrak 25 miligram, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a ditempatkan kedalam labu volumetric 25 milliliter, dan pelarutnya ditambahkan mencapai tanda yang ditentukan. Kemudian ekstrak disiapkan dengan konsentrasi 12.5, 25, 50, 75, 100 ppm. Pada setiap konsentrasi dipindahkan kedalam labu volumetric 10 milliliter dan tambahkan etanol p.a hingga mencapai tanda yang ditentukan.

7. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Fraksi Kulit Batang Jamblang

Pengujian dilakukan dengan cara memipet larutan induk ekstraksi kulit batang jamblang sebanyak 500 mL masing-masing

konsentrasi, dilanjutkan dengan penambahan 3,5 mL larutan DPPH. Selanjutnya, dinkubasi selama 30 menit, kemudian dianalisis absorbansinya memakai spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm dan perlakuan dilakukan berulang secara triplo.

8. Penentuan IC₅₀

Ekstrak etanol, hasil fraksi maupun vitamin C dari berbagai konsentrasi masing-masing diambil 1 mL ditambahkan 1 mL DPPH, lalu divorteks dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Ukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm. Dilakukan pengukuran serapan DPPH sebagai blanko pada panjang gelombang yang sama. Setelah diperoleh nilai absorban hitung % perendaman dengan menggunakan persamaan (Mbaoji *et al.*, 2016) di bawah ini. Dari % perendaman yang diperoleh ditentukan IC₅₀ yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 50% radikal bebas. Persentase penghambatan terhadap radikal DPPH dari masing - masing konsentrasi sampel dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut :

$$\% \text{Peredaman} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing -masing konsentrasi, konsentrasi sampel dan persen penghambatan dapat didapatkan pada sub x dan y dalam persamaan regresi linear $y = a + bx$. Persamaan ini untuk menentukan nilai IC₅₀ dari masing-masing sampel. Nilai IC₅₀ dari setiap sampel. Nilai IC₅₀ merupakan konsentrasi sampel yang dapat menurunkan nilai radikal bebas DPPH sebesar 50% . IC₅₀ adalah besarnya konsentrasi penghambatan suatu larutan uji dalam mereduksi aktivitas radikal bebas sebesar 50% dimana semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin besar aktivitas antioksidan (Widyasanti *et al.*, 2016).

3.7 Analisis Data

Data hasil skrining fitokimia dan standarisasi ekstrak yang diperoleh untuk dianalisis dan di muat dalam bentuk tabel, Hasil pengujian antioksidan ,kadar flavonoid dan fenolik total dinyatakan sebagai rata-rata standar deviasi (SD) dari 3 kali pengulangan. Data diperoleh dari hasil pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan dilakukan analisis data secara statistic menggunakan regresi linear menggunakan *Microsoft excel*.



3.8 Prosedur Percobaan

Berikut ini adalah prosedur percobaan yang akan dilakukan :

