

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Metode yang dilakukan adalah jenis penelitian kuantitatif dan eksperimental. Pada Penelitian ini dilakukan pengujian perbedaan antioksidan ekstrak etanol merupakan jenis penelitian kualitatif dengan dilakukan skrining fitokimia serta penelitian kuantitatif dengan dilakukan pengujian antioksidan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) dan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi sampel penelitian ini menggunakan ekstrak etanol 96%, daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk) K. Schum) yang berasal dari pegunungan daerah Loji, Kecamatan Tegalwaru, Kabupaten Karawang, Provinsi Jawa Barat, yang digunakan untuk pembuatan simplisia lalu diekstraksi.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Peralatan yang digunakan yaitu timbangan analitik (adam), gelas beaker (pyrex), gelas ukur (iwaki), *water bath* (mammert), kain hitam, botol coklat, blender (cosmos), batang pengaduk (pyrex), tabung reaksi, *rotary evaporator* (eyela), mikropipet, toples kaca kedap suara, cawan penguap (pyrex), kurs porselin, *oven* (mammert), desikator (duran), *hot plate*, labu ukur (pyrex), corong (pyrex), kertas saring, erlenmeyer (pyrex), kuvet, cawan porselin (pyrex), kurs, tanur (thermonyne), spektrofotometri UV-Vis (thermo), mortar dan alu, *centrifuge*, vial, *blue tip*.

3.3.2 Bahan

Penelitian kali ini menggunakan bahan yaitu : ekstraksi maserasi etanol 96%, etanol p.a, daun terubuk segar (*Saccharum spontaneum* var.

edulis (Hassk) K. Schum) serbuk DPPH, aquadest, metanol p.a, magnesium, asam askorbat (vitamin C), air kloroform, HCL, FeCl₃, vanillin, dragendroff, mayer, lieberman buchard, etil asetat, asam klorida, alkohol, eter, asam asetat, NaOH, KH₂PO₄, asam oksalat, K₃Fe (CN)₆, trikloroasetat (TCA).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Klasifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk) K. Schum.).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah standarisasi mutu simplisia, skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk) K. Schum.) dengan perbandingan metode DPPH dan metode FRAP.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

3.1 Tabel Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas				
Ekstrak etanol daun terubuk	Ekstrak kental yang terbuat dari daun terubuk yang sudah di ekstraksi dengan etanol 70%	Observasi	Nominal	%
Variabel Terikat				
Kadar air	Salah satu parameter yang penting untuk menentukan kadar air didalam jamu	Gravimetri	Rasio	%
Kadar sari larut etanol	Mengetahui kadar senyawa yang larut dalam etanol	Gravimetri	Ordinal	%

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Kadar sari larut air	Menentukan kemampuan dari bahan tersebut apakah tersari dalam pelarut air	Gravimetri	Ordinal	%
Kadar total abu	Menentukan jumlah abu yang berusul dari pengotor yang ada dipasir atau tanah.	Gravimetri	Ordinal	%
Kadar tidak larut asam	Mengetahui jumlah kadar abu yang diperoleh dari factor eksternal, berasal dari pengotor yang berasal dari pasir atau tanah.	Grvimetri	Ordinal	%
Uji Aktivitas Antioksidan	Kemampuan senyawa uji (SNEDDS dan non SNEDDS) untuk menangkap radikal bebas DPPH dibandingkan dengan FRAP	Menggunakan instrumen Spektrofotometri untuk menguji DPPH dan metode FRAP	Rasio	Absorbansi

3.5 Prosedur penelitian

3.5.1 Determinasi Tanaman

Pada proses awal penelitian ini yaitu dilakukan identifikasi dan determinasi tumbuhan terubuk dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis yang terdapat pada literatur. Determinasi dilakukan di Universitas Padjajaran (UNPAD) Departemen Biologi FMIPA, terhadap sampel tanaman secara utuh dari bagian akar hingga daun.

3.5.2 Penyiapan simplisia

Tanaman terubuk diambil di daerah Puncak Loji Karawang. Proses penyiapan simplisia dilakukan dengan pengumpulan, sortasi basah, pencucian, dilakukan perajangan untuk mendapatkan bahan yang bagus dan baik, pengeringan di bawah sinar matahari ditutup menggunakan kain hitam

hingga mudah patah saat disentuh, pisahkan daun yang telah mengering dari benda asing, dihaluskan, disaring lalu tempatkan di tempat yang kering.

3.5.3 Parameter Standarisasi Simplisia

1. Parameter non spesifik

a. Kadar Air

Penetapan kadar air dengan teknik gravimetri yaitu memanaskan kurs porselin dipanaskan di oven dalam suhu 105°C dalam kurun waktu 30 menit, lalu ditiriskan ke dalam desikator dalam kurun waktu 30 menit dan setelah itu ditera (ditimbang), serbuk simplisia ditimbang sebanyak 2 gram dalam kurs porselin, sampel dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Masukkan kurs porselin ke dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang (Aulia *et al*, 2023). Rumus Kadar Air (SNI, 2013) :

$$\text{Kadar Air} = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} = 100\% \dots\dots\dots \text{Persamaan (1)}$$

Keterangan =

W0 = Berat kurs kosong

W1 = Berat kurs + sampel sebelum dioven

W2 = Berat kurs + sampel setelah dikeringkan setelah dioven

b. Kadar Abu Total

Penetapan kadar abu bertujuan untuk mengetahui kandungan mineral dalam simplisia. Penetapan kadar abu tidak larut asam bertujuan untuk mengetahui kadar senyawa yang tidak larut asam, misalnya silika, logam- logam berat seperti Pb dan Hg (Depkes RI, 1985). Nilai non spesifik ini sudah sesuai dengan ketentuan standar yang ditetapkan oleh literatur dari panduan Kementerian Kesehatan RI (Kemenkes RI, 2020; Syamsul, 2020). Simplisia 2 garm ditimbang dan dituangkan kedalam kurs yang telah ditera dan dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dan dinginkan. Pijarkan dilakukan pada suhu 500-600°C menggunakan tanur selama 3 jam, kemudian hasil pemijaran didinginkan dalam

desikator, serta ditimbang berat abu yang dihasilkan (Aulia *et al.*, 2023). Rumus Kadar Abu Total (SNI, 2013) :

$$\text{Kadar Abu} = \frac{w_2 - w_0}{w_1 - w_0} \times 100\% \dots\dots\dots \text{Persamaan (2)}$$

c. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu hasil pembakaran sampel direaksikan dengan asam klorida encer untuk melarutkan komponen-komponen yang larut dalam asam. Bagian yang tidak larut (residu) kemudian dipisahkan melalui proses filtrasi, dicuci, dan dikeringkan dengan cara dipanaskan dalam oven. Residu kering kemudian dipanaskan pada suhu tinggi dalam tanur untuk menghilangkan senyawa organik yang tersisa. Sampel yang telah dipanaskan kemudian didinginkan dalam desikator sebelum dilakukan analisis lebih lanjut (Aulia *et al.*, 2023).

$$\text{KATL Asam} = \frac{\text{Berat Abu Tidak Larut Asam}}{\text{BSA}} \times 100\% \dots\dots \text{Persamaan (3)}$$

2. Parameter spesifik

a. Kadar Sari Larut Air

Penetapan standardisasi dilakukan dengan cara ditimbang simplisia sebanyak 5 gram (gr) kemudian dimaserasi selama 18-24 jam dengan 100 mililiter (mL) air-kloroform untuk kadar sari larut air dan 100 ml etanol untuk kadar sari larut etanol, kemudian filtrat diambil sebanyak 20 mililiter (mL) dan diuapkan hingga bobot konstan (Latifa, 2022) selanjutnya hasil kadar sari larut air dan etanol dihitung. Rumus perhitungan kadar sari larut air adalah sebagai berikut :

$$\text{KSL Air} = \frac{\text{Berat sari larut air}}{\text{berat bahan awal}} \times \frac{100}{20} \times 100\% \dots\dots\dots \text{Persamaan (4)}$$

b. Kadar Sari Larut Etanol

Kadar sari larut etanol dilakukan untuk mengetahui kadar senyawa larut dalam etanol, baik senyawa polar maupun non polar. Kandungan sari larut air lebih kecil daripada kadar sari larut etanol, ini berarti senyawa kimia lebih larut dalam etanol dibandingkan larut air. Sejumlah 5 gram simplisia dimaserasi didalam labu

Erlenmeyer dengan 100 mililiter etanol 96%. Campuran sesekali diaduk per enam jam dan didiamkan selama 18 jam. Sampel disaring dengan cepat untuk tidak terjadinya penguapan etanol, kemudian 20 mililiter filtrat diuapkan diatas penangas air hingga mongering pada cawan penguap yang telah ditara. Zat yang Tersisa dipanaskan pada 105°C sampai berat konstan tercapai. .Parameter spesifik sudah sesuai dengan ketentuan standar yang ditetapkan oleh literatur dari panduan Kementerian Kesehatan RI (Kemenkes RI, 2020; Syamsul, 2020). Persentase senyawa yang larut pada etanol 96% dihitung berdasarkan berat awal ekstrak dengan menggunakan

$$\text{KSL Air} = \frac{\text{Berat sari larut air}}{\text{berat bahan awal}} \times \frac{100}{20} \times 100\% \dots\dots\dots \text{Persamaan (5)}$$

3.5.4 Proses Ekstraksi Terubuk

Ekstraksi daun terubuk dengan teknik maserasi memakai pelarut Etanol 96%. Perbandingan pada maserasi simplisia dan pelarut 1:10. Ekstraksi daun terubuk serbuk simplisia timbang dilakukan sebanyak 3 kali perlakuan yaitu 500 gram dalam 5000 mL pelarut, 300 gram dalam 3000 mL pelarut, 200 gram dalam 2000 mililiter (mL) pelarut Etanol 96% dimasukkan ke dalam wadah maserasi selama 3 hari setiap sesinya. Setiap perlakuan sesekali ekstrak diaduk setiap 6 jam sekali. Filtrat kemudian disaring menggunakan corong *buchner*. Filtrat yang didapatkan setelah itu diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 50-60°C. Ekstrak diuapkan menggunakan waterbath hingga memperoleh ekstrak kental (Aulia *et al.*, 2023).

$$\text{Rendemen\%} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia Kering}} \times 100\% \dots\dots\dots \text{Persamaan (6)}$$

3.5.5 Skrining fitokimia

a. Alkaloid

Sedikit sampel ekstrak di tambahkan dengan sedikit HCl 1%, lalu tambahkan 1 mL pereaksi mayer. Adanya endapan atau kekeruhan menandakan senyawa alkaloid (Riwanti & Izazih, 2019).

b. Flavonoid

Ekstrak kental dilarutkan dalam metanol sebagai pelarut. Ekstrak daun terubuk kemudian direaksikan dengan magnesium dan asam klorida pekat. Perubahan warna larutan menjadi kuning, jingga, merah, atau hijau mengindikasikan adanya senyawa flavonoid dalam sampel (Fajrianty *et al.*, 2018).

c. Tanin

Sedikit sampel ekstrak ditambahkan 10 mL aquades lalu dididihkan. Tambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Adanya warna hijau kecoklatan atau hitam kebiruan menandakan senyawa (Utami *et al.*, 2017).

d. Saponin

Sebanyak 0,5 gram sampel direbus dalam 10 mL air. Setelah didinginkan dan dikocok, terbentuk busa. Penambahan HCl 2N bertujuan untuk menguji kestabilan busa. Adanya busa yang persisten setelah penambahan asam mengindikasikan adanya saponin dalam sampel (Sulistyarini *et al.*, 2017).

e. Steroid dan Triterpenoid

Simplisia disari dengan eter, kemudian sari eter diuapkan (diangin-angin) hingga kering. Pada residu ditetaskan pereaksi *Lieberman-Burchard*. Terbentuknya warna ungu menunjukkan bahwa dalam simplisia terkandung senyawa triterpenoid, sedangkan bila terbentuk warna hijau-biru menunjukkan adanya senyawa steroid (Nurviana & Gunarti, 2016).

f. Fenolik

Tuang 1 milliliter ekstrak pada tabung reaksi dan masukkan 10 tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terciptanya warna merah, biru, ungu, hitam atau hijau (Nurviana & Gunarti, 2016)

g. Kuinon

Larutan ekstrak etanol ditambahkan NaOH 1N, kemudian diamati perubahan warnanya. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning (Kusumo *et al.*, 2022).

h. Monoterpenoid dan sesquiterpenoid

Ekstrak sampel dalam eter diuapkan hingga kering, residu kemudian direaksikan dengan pereaksi vanillin 10%-H₂SO₄. Terbentuknya warna mengindikasikan adanya senyawa tertentu dalam sampel (Aulia *et al*, 2023).

3.5.6 Uji Antioksidan Metode DPPH

1. Pembuatan Larutan DPPH 50 ppm

Larutan DPPH dibuat dengan konsentrasi 50 ppm yakni dengan menimbang sebanyak 2,5 milligram (mg) kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai 50 mililiter (mL) dan ditambahkan pelarut secukupnya hingga mencapai volume yang diinginkan, dilanjutkan dengan pencampuran hingga homogen dan dilapisi alumunium foil. Dalam setiap percobaan, larutan DPPH dibuat baru (Aulia *et al.*, 2023).

2. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan DPPH 50 ppm sebanyak 2 mililiter (mL) ditambahkan ke dalam botol coklat dan ditambahkan dengan metanol p.a sebanyak 2 mL, diinkubasi selama 30 menit (Aulia *et al.*, 2023).

3. Penentuan Panjang Gelombang

Ambil larutan DPPH 50 ppm dan dipipet ke dalam kuvet sebanyak 4 milliliter (mL), kemudian tentukan spektrum serapan memakai spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 400-800 nm serta ditemukan panjang gelombang optimumnya (Aulia *et al.*, 2023).

4. Penentuan Serapan Absorbansi

Larutan DPPH 2 mililiter (mL) dimasukkan ke botol coklat dan ditambahkan dengan metanol p.a sebanyak 2 mililiter (mL), diinkubasi selama 30 menit suhu 37°C, lalu diukur serapan dengan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 517 nm. Perlakuan dilakukan di ruangan yang tertutup dan terhindar dari cahaya, serta pengerjaan dilakukan secara triplo (Aulia *et al*, 2023).

5. Pembuatan Larutan Vitamin C

Vitamin C sebanyak 100 ppm ditimbang 2,5 milligram (mg), kemudian dilarutkan dalam metanol p.a 25 mililiter (mL), dituangkan ke dalam labu ukur 25 mililiter sampai tanda yang ditentukan, dan larutan diisi hingga tanda. Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi 10 ppm, 8 ppm, 6 ppm, 4 ppm, 2 ppm. Setiap konsentrasi dilarutkan dalam 10 mililiter (mL) metanol p.a sampai tanda batas. Pindahkan 2 mililiter (mL) setiap larutan uji ke dalam botol coklat, dimasukkan ke dalam botol coklat, tambahkan 2 mililiter (mL) larutan DPPH, dan kocok hingga homogen. Kemudian, biarkan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya, serapan larutan uji dinilai spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 517 nm (Aulia *et al.*, 2023).

6. Pembuatan Larutan Ekstraksi Daun Terubuk

Daun Terubuk Ekstrak Etanol dibuat larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm dengan mengukur ekstrak 25 miligram (mg), kemudian dilarutkan dengan metanol p.a ditempatkan kedalam labu *volumetric* 25 milliliter (mL), dan pelarutnya ditambahkan mencapai tanda yang ditentukan. Kemudian ekstrak disiapkan dengan konsentrasi 125 ppm, 100 ppm, 75, 50 ppm, 25 ppm. Pada setiap konsentrasi dipindahkan kedalam labu *volumetric* 10 mililiter (mL) dan tambahkan metanol p.a hingga mencapai tanda yang ditentukan (Aulia *et al.*, 2023).

7. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol

Daun terubuk pengujian dilakukan dengan cara memipet larutan induk ekstraksi daun terubuk sebanyak 2 milliliter (mL) masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan penambahan 2 mililiter (mL) larutan DPPH. Selanjutnya, diinkubasi selama 30 menit, kemudian dianalisis absorbansinya memakai spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 517 nm dan perlakuan dilakukan berulang secara triplo (Aulia *et al.*, 2023).

3.5.7 Uji Antioksidan Metode FRAP

1. Pembuatan Reagen

a. Larutan Dapar fosfat 0,2 M Ph 6,6

Larutan dibuat sesuai Farmakope Indonesia dengan menimbang 2 gram (gr) NaOH dan dilarutkan dengan akuades bebas CO₂ hingga tepat 250 mililiter (mL) dalam labu takar. Kemudian sebanyak 6,8 gram (gr) KH₂PO₄ yang dilarutkan dengan akuades bebas CO₂ 250 mililiter (mL) dalam labu takar. Kemudian dipipet sebanyak 16,4 mililiter (mL) NaOH dimasukkan dalam labu takar dan dicampurkan 50 mililiter (mL) KH₂PO₄, selanjutnya diukur sampai Ph 6,6 dan dicukupkan akuades bebas CO₂ hingga 200 mililiter (mL) (Haryoto, 2024).

b. Larutan FeCl₃ 0,1%

Larutan disiapkan dengan melarutkan 25 miligram (mg) FeCl₃ dalam akuades dalam labu takar hingga 25 mililiter (mL) (Haryoto, 2024).

c. Larutan Oksalat 1%

Larutan diapkan dengan melarutkan 250 miligram (mg) asam oksalat dalam air bebas CO₂ dan diencerkan dalam labu takar 25 mililiter (mL) (Haryoto, 2024).

d. Larutan Kalium Ferisianida 1%

Larutan disiapkan dengan melarutkan 250 miligram (mg) kalium ferisianida dalam akuades dan diencerkan dalam labu takar 25 mililiter (mL) (Haryoto, 2024).

e. Larutan Asam Trikloroasetat 10%

Larutan disiapkan dengan melarutkan 2,5 gram (gr) TCA dalam akuades dan diencerkan dalam labu takar 25 mililiter (mL) (Haryoto, 2024).

f. Pembuatan Larutan Stok

Sebanyak 100 miligram (mg) ekstrak etanol 96% daun terubuk dilarutkan dalam 100 mililiter (mL) metanol p.a dengan masing-masing konsentrasi 25, 50, 75, 100 dan 125 mg/L (Haryoto, 2024).

g. Larutan Kurva Baku

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 25 miligram (mg) vitamin C dilarutkan dengan metanol p.a hingga batas labu ukur 25 mililiter (mL). selanjutnya dari larutan stok 1000 ppm diambil masing-masing 0,25; 0,5; 0,75; 0,1; dan 1,25 mililiter (mL) ditempatkan dalam labu ukur 10 mililiter (mL) yang berbeda dan diencerkan metanol p.a hingga 10 mililiter (mL) dan homogenkan. Konsentrasi larutan standar 1000 ppm vitamin C yakni 25, 50, 75, 100 dan 125 mg/L (Haryoto, 2024).

2. Analisis Kuantitatif Antioksidan dengan Metode FRAP**a. Penentuan Panjang Gelombang**

Diambil 1 mililiter (mL) dari larutan stok 100 ppm vitamin C murni, kemudian ditambahkan 1 mililiter metanol p.a vitamin C, 1 mililiter (mL) dapar fosfat dan 1 mililiter (mL) $K_3Fe(CN)_6$ 1%. Larutan digojog dan diinkubasi selama 20 menit dalam suhu 50°C. Lalu ditambahkan 1 mililiter (mL) TCA disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Diambil 1 mililiter (mL) supernatan (cairan lapisan atas hasil sentrifugasi) ditambah 0,5 mililiter (mL) $FeCl_3$ 0,1% dan metanol p.a hingga tanda batas dalam labu ukur 5 ml. diinkubasi selama 10 menit dan diukur absorbansi di 400-800 nm (Nasir *et al.*, 2021).

b. Penentuan Absorbansi Ekstrak dan Vitamin C

Untuk menentukan kapasitas antioksidan total ekstrak daun terubuk dilakukan uji reduksi besi(III) menjadi besi(II) berdasarkan metode Hinneburg *et al* (2006). Sampel ekstrak sebanyak 1 mL dari larutan stok dilarutkan dengan akuades, tambahkan 2,5 mililiter (mL) dapar fosfat (pH 6,6) dan 2,5 mililiter (mL) kalium ferisianida

1%. Campuran ini kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit untuk memungkinkan terjadinya reaksi reduksi. Selesai inkubasi, campuran ditambah dengan 2,5 mL asam trikloroasetat 1% untuk menghentikan reaksi. Campuran selanjutnya disentrifuge pada kecepatan 2790 x g selama 10 menit. Sebanyak 2,5 mL supernatan (lapisan atas) selanjutnya dicampur dengan 2,5 mL air dan 0,5 mL besi(III) klorida 0,1%. Proses di atas sama halnya pada pengujian penangkapan radikal pada vitamin C dan blanko (tanpa ekstrak). Absorbansi ekstrak, vitamin C, dan blanko diukur pada panjang gelombang 700 nm (Nasir *et al.*, 2021).

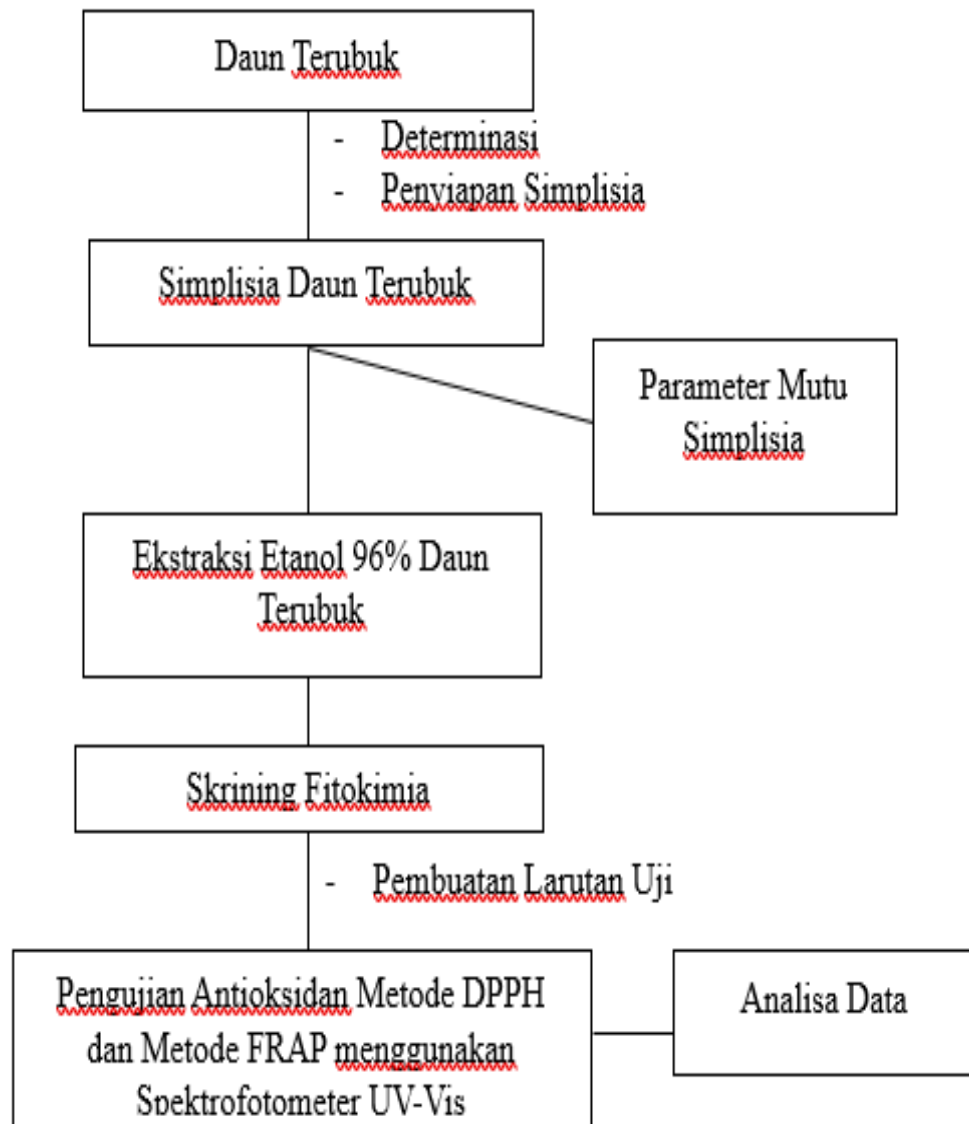
c. Penentuan Nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*)

Inhibitory Concentration (IC₅₀) adalah konsentrasi inhibitor yang dibutuhkan untuk mengurangi aktivitas biologis sebesar 50%. Untuk menentukan nilai IC₅₀, dilakukan perhitungan persentase penghambatan pada berbagai konsentrasi sampel. Data konsentrasi dan persentase penghambatan kemudian diplot pada grafik dan dianalisis menggunakan Graphpad untuk mencari nilai IC₅₀ (Aulia *et al.*, 2023).

3.6 Analisis Data

Data hasil identifikasi skrining fitokimia dinyatakan dalam bentuk tabel. Hasil analisis antioksidan dinyatakan sebagai rata-rata standar deviasi (SD) dari tiga kali pengulangan. Data diperoleh dari hasil spektrofotometer UV-Vis dan dilakukan dengan analisis data secara statistik menggunakan Graphpad.

3.7 Diagram Alir



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian