BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan yaitu dari bulan Februari hingga bulan Juni 2025 di Laboratorium Kimia, Laboratorium Bahan Alam, dan Laboratorium Instrumen Prodi S-1 Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: spektrofotometri UV-Vis *(Shimadzu)*, waterbath (*Biobase*), oven, blender (*Miyako*), timbangan analitik, toples kaca, rak tabung, aluminium foil, mikropipet, *yellow tip*, tisu, kertas saring dan alat-alat gelas seperti: gelas beaker *(Pyrex)*, tabung reaksi *(Iwaki)*, gelas ukur *(Pyrex),* corong, labu ukur 5, 10, dan 25 mL, batang pengaduk, pipet tetes, kuvet *(Helma)*.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu: ekstrak daun kelengkeng, metanol, etil asetat, n-heksan, serbuk ABTS, aquadest, $K_2S_2O_8$, kuarsetin, metanol p.a, sebuk Mg, HCl pekat, ammonia pekat, asam sulfat 2 N, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Wagner, $FeCl_3$ 1%, H_2SO_4 anhidrat dan H_2SO_4 pekat.

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental di laboratorium, untuk mengetahui aktivitas antioksidan

dari berbagai jenis pelarut dan nilai IC_{50} pada daun kelengkeng dengan metode ABTS.

3.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu pelarut metanol, etil asetat dan n-heksan.

3.3.3 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil dari IC_{50} pada pengujian antioksidan ekstrak daun kelengkeng dengan metode ABTS.

3.3.4 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah tempat pengambilan sampel, jenis sampel, suhu ekstraksi, tempat penelitian, metode, jenis pelarut, cara pembuatan dan uji yang dilakukan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi S-1 Universitas Bhamada Slawi. Proses determinasi pada tanaman bertujuan untuk menghindari tercampurnya tanaman yang akan diteliti dengan tanaman lain dan untuk memastikan kebenaran tanaman yang akan diteliti (Klau & Hesturini, 2021).

3.4.2 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan yaitu daun kelengkeng yang diperoleh dari Desa Dukuh Benda, Kecamatan Bumijawa, Kabupaten Tegal. Daun kelengkeng yang digunakan sebanyak 4 kg. Dimana daun yang telah diambil kemudian disortasi basah menggunakan air mengalir. Setelah itu dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C sampai kadar

airnya kurang dari 10% dan ditimbang simplisia kering serta dihaluskan menggunakan blender hingga diperoleh serbuk daun kelengkeng (Seran et al., 2023).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 300 gram serbuk simplisia daun kelengkeng dimaserasi masing-masing menggunakan pelarut metanol, etil asetat dan n-heksan sebanyak 1.500 mL dengan perbandingan 1:5 selama 3 hari. Kemudian saring hasil maserasi untuk memisahkan residu dan maserat. Hasil ekstraksi selanjutnya dipekatkan dengan waterbath pada suhu 60°C (Seran et al., 2023).

Berikut ini rumus perhitungan persentase (%) rendemen ekstrak yaitu sebagai berikut (Badriyah & Farihah, 2022):

$$\%\ \text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (g)}}{\text{Berat simplisia (g)}}\ X\ 100\ \%$$

3.4.4 Uji Parameter Ekstrak

a. Pengujian Parameter Spesifik

1. Pemeriksaan Organoleptik

   Pemeriksaan organoleptik pada ekstrak secara fisik menggunakan panca indera meliputi bentuk, bau, dan warna, (Maryam et al., 2020).

b. Pengujian Parameter Non Spesifik

1. Pengujian Kadar Air

   Ekstrak daun kelengkeng dengan pelarut metanol, etil asetat dan n-heksan ditimbang sebanyak 0,5 gram diletakkan pada piring aluminium *moisture analyzer* diatur pada

temperature 105°C sehabis itu ditutup dan secara otomatis pemanas halogen menyala serta mulai memanaskan ekstrak hingga berat ekstrak menjadi konstan. Berat ekstrak dikatakan konstan bila lampu halogen mati serta hasil kandungan air telah muncul. Ketentuan kualitas kandungan air pada ekstrak ialah ≤10% (Ditjen POM, 2000).

2. Pengujian Susut Pengeringan

Timbang ekstrak daun kelengkeng 1-2 gram dalam botol timbang beserta tutupnya yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit. Dengan menggoyangkan botol timbang, ratakan simplisia sampai terbentuk lapisan setebal 5-10 mm, masukkan dalam oven, buka tutupnya, keringkan pada suhu 105°C dengan waktu 30 menit. Sebelum pengeringan biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam desikator hingga suhu ruang (Kemenkes, 2017).

$$\%\ \text{Susut pengeringan} = \frac{\text{A} - \text{B}}{\text{B}}\ X\ 100\ \%$$

Keterangan:
A = Botol timbang + sampel sebelum dipanaskan (g)
B = Botol timbang + sampel setelah dipanaskan (g)

3. Pengujian Kadar Abu

Timbang 2 gram masing-masing ekstrak daun kelengkeng. Masukan ekstrak dalam krus silikat yang sebelumnya sudah dipijarkan dan ditimbang. Pijarkan

perlahan-lahan sampai ekstrak menjadi abu, dinginkan dan timbang (Kemenkes, 2017).

$$\% \text{ Kadar abu} = \frac{\text{W2} - \text{W0}}{\text{W1}} \; X \; 100 \; \%$$

Keterangan:
W0 = Berat krus kosong (g)
W1 = Berat ekstrak awal (g)
W2 = Berat krus + berat ekstrak setelah di abukan (g)

4. Pengujian Kadar Abu Tak Larut Asam

Abu hasil penentapan kadar abu dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dalam asam, kemudian disaring menggunakan kertas saring dan dipijarkan (Kemenkes, 2017).

$$\text{Kadar abu tak larut asam} = \frac{\text{W3} - \text{C} - \text{W0}}{\text{W1}} \; X \; 100 \; \%$$

Keterangan:
W0 = Berat krus kosong
C = Berat kertas saring
W1 = Berat ekstrak awal
W3 = Berat krus + abu yang tidak larut asam

3.4.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa fitokimia pada tanaman secara kualitatif. Berikut ini beberapa skrining fitokimia menggunakan metode reaksi warna meliputi uji falavonoid, uji alkaloid, uji tanin, uji saponin dan uji triterpenoid/steroid.

a. Uji Flavonoid

Pengujian dikatakan positif jika menghasilkan warna kuning, orange, dan merah, yang menunjukan adanya senyawa flavonoid. Ambil sebanyak 1 gram ekstrak dari masing-masing sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan 2 mg serbuk Mg dan 3 tetes HCl pekat (Rahmasiahi et al., 2023).

b. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram dari masing-masing sampel dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL HCl dan aquadest 9 mL panaskan selama 2 menit. Setalah dingin, saring larutan dan bagi menjadi tiga tabung. Pada tabung pertama ditambahkan 1 tetes pereaksi Mayer, adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih. Pada tabung kedua ditambahkan 1 tetes pereaksi Dragendorff dan terbentuknya endapan berwarna jingga menunjukan adanya alkaloid, tabung ketiga ditambahkan 1 tetes pereaksi Wagner dan terbentuknya endapan berwarna coklat menunjukan adanya alkaloid (Florensia & Wijaya, 2023).

c. Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dari masing-masing sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 10 mL aquadest, dikocok hingga homogen. Kemudian dipanaskan selama 2-3 menit. Didinginkan, setelah dingin kocok kuat-kuat. Tambahkan 1 tetes HCl 2N jika timbul busa. Adanya busa yang stabil selama 10 detik menunjukan sampel mengandung saponin (Rahmah et al., 2023) .

d. Tanin

Pengujian dikatakan positif jika menghasilkan warna hijau kehitaman, menunjukan adanya tannin. Ambil 0,5 gram ekstrak dari masing-masing sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 5 mL air panas dan kocok sampai tercampur. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes $FeCl_3$ 1% (Oktapiya et al., 2022).

e. Triterpenoid/Steroid

Pengujian dikatakan positif jika menghasilkan warna ungu atau jingga, itu menunjukan adanya triterpenoid. Jika larutan berwarna biru atau hijau menandakan adanya steroid. Ambil sebanyak 0,5 gram ekstrak dari masing-masing sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian tambahkan 1 tetes asam asetat anhidrat dan 2 tetes asam sulfat pekat (Kiyato et al., 2022).

3.4.6 Penentuan Aktivitas Antioksidan Metode ABTS

a. Pembuatan Larutan ABTS

Sebanyak 18 mg serbuk ABTS dilarutkan dengan aquadest dalam 5 mL labu ukur. Selanjutnya sebanyak 3,5 mg kalium persulfat dilarutkan dalam 5 mL aquadest di labu ukur yang lain. Setelah itu, kedua larutan dicampurkan dan volume totalnya disesuaikan menjadi 25 mL dengan menambahkan metanol p.a dan diinkubasi selama 12-16 jam (Saputri et al., 2020).

b. Pembuatan Larutan Kontrol ABTS

Sebanyak 1 mL larutan ABTS dipindahkan ke dalam labu ukur dan ditambahkan 5 mL metanol p.a. campuran ini kemudian diukur absorbansinya menggunakkan spektrofotometri UV-Vis pada

rentang panjang gelombang 400-800 nm (Jatmiko & Mursiti, 2021).

c. Pembuatan Larutan Baku Pembanding Kuersetin

Membuat larutan kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm dengan menimbang 10 mg bubuk kuersetin, dan melarutkannya dalam metanol p.a dengan labu ukur 100 mL. Dari larutan stok ini, kemudian dibuat larutan seri dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm dengan mengambil volume larutan stok berturut-turut sebanyak 0,25; 0,5; 0,75; 1 dan 1,25 mL. Selanjutnya masing-masing larutan tersebut diencerkan dengan metanol p.a hingga volume total 5 mL dalam labu ukur (Sari, 2022).

d. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum

Ambil larutan stok ABTS sebanyak 1 mL dan diencerkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 10 mL. Absorbansi larutan diukur pada rentang panjang gelombang 400-800 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimum (Azizah, 2023).

e. Penentuan *Operating Time* (OT)

Sebanyak 1 mL larutan standar kuersetin 15 ppm dicampurkan dengan 2 mL larutan stok ABTS. Kemudian, absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum dengan interval waktu 2 menit selama 30 menit untuk memantau absorbansi secara berkala. Pengukuran ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan berdasarkan penurunan absorbansi seiring waktu (Devi et al., 2022).

f. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Baku Pembanding

Larutan kuersetin dibuat dari larutan induk kuarsetin 100 ppm dengan deret konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm atau dipipet masing-masing sebanyak 0,25; 0,5; 0,75; 1; dan 1,25 mL dalam labu ukur 5 mL, tambahkan metanol p.a hingga tanda batas. Selanjutnya masing-masing konsentrasi dipipet 1 mL dan dicampurkan dengan 2 mL larutan stok ABTS. Larutan diinkubasi selama *operating time* dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometri UV-Vis. Untuk memastikan akurasi hasil, lakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk setiap konsentrasi larutan kuersetin (Siska et al., 2020).

g. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kelengkeng

Ekstrak sebanyak 25 mg dilarutkan dalam 25 mL metanol p.a sebagai larutan ekstrak 1000 ppm. Masing-masing larutan ekstrak dibuat larutan seri dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200 dan 250 mL lalu diencerkan dengan metanol p.a hingga volume total 5 mL. Selanjutnya masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL dicampurkan dengan 2 mL larutan stok ABTS. Larutan diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis (Afifah et al., 2023).

3.5 Analisa Data

a. Perhitungan Regresi Linier

Data absorbansi yang diperoleh dari pengukuran dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier sebagai y dan nilai x sebagai konsentrasi larutan baku. Persamaan regresi linier ditulis dengan rumus:

$$y = bx + a$$

Keterangan:
y = absorbansi
a = tetapan regresi (*intersep*)
x = konsentrasi (ppm)
b = kemiringan kurva (*slope*)

b. Perhitungan % Inhibisi

Penentuan aktivitas antioksidan hasil pengujian ekstrak daun kelengkeng dengan pelarut metanol, etil asetat dan n-heksan dengan metode ABTS dihitung sebagai % inhibisi menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi ABTS} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi ABTS}} \; X \; 100 \; \%$$

c. Perhitungan Nilai IC_{50}

Perhitungan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50%*) menunjukan besarnya konsentrasi senyawa larutan uji yang mampu meredam proses oksidasi sebesar 50%. Menggunakan persamaan regresi linier yang menunjukan hubungan antara konsentrasi larutan uji (x) dan % inhibisi (y), sehingga didapatkan persamaan regresi linier y = bx + a. Nilai IC_{50} dihitung menggunakkan persamaan regresi linier antara konsentrasi versus % inhibisi. diperoleh dari nilai x setelah mengubah y = 50. Perhitungan nilai IC_{50} dapat dituliskan dengan rumus:

$$\begin{aligned} y &= 50 \\ y &= bx + a \\ 50 &= bx + a \\ x &= \frac{50-a}{b} = IC_{50} \end{aligned}$$

Aktivitas antioksidan dengan kategori nilai IC_{50} < 50 ppm menunjukkan antioksidan sangat kuat, kemudian untuk kategori nilai

IC_{50} 50-100 ppm antioksidan kuat, kategori nilai IC_{50} antara 101-250 ppm masuk dalam kategori sedang, nilai IC_{50} antara 250-500 ppm termasuk kategori lemah dan nilai IC_{50} > 500 ppm dianggap memiliki aktivitas dalam menangkal radikal bebas dalam kategori tidak aktif (Martiningsih et al., 2016).

d. Pengolahan Data dan Analisa Data

Data diperoleh dari hasil pengukuran nilai IC_{50} terhadap ekstrak daun kelengkeng (*Dimocarpus longan* L.) menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan dilakukan analisis data menggunakan SPSS. Uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* jika nilai signifikasi >0,05 data terdistribusi normal dan dilanjutkan dengan uji *Homogeneity of Variances* jika nilai signifikasi >0,05 maka data terdistribusi homogen. Dan dilanjutkan uji *One Way Anova*, apabila nilai signifikan yang didapatkan >0,05 maka H0 diterima dan H1 ditolak, jika nilai <0,05 maka H0 ditolak. Untuk uji akhir dilakukan uji *post hoc*.