

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian yang bersifat eksperimental di laboratorium dengan menggunakan simplisia daun sungkai dan ekstrak Etanol daun sungkai (*Peronema canescens* J) yang diuji dengan menggunakan pereaksi kimia spesifik. Variabel penelitian diantaranya ekstrak serbuk simplisia daun sungkai, senyawa alkaloid, flavonid, saponin, tanin, steroid/triterpenoid, dan nilai IC₅₀.

B. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah ekstrak daun sungkai (*Peronema canescens* J) yang diperoleh di Kecamatan Gisting, Kabupaten Tanggamus, Lampung.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tangjungkarang untuk melakukan proses identifikasi tanaman, proses ekstraksi, dan uji skrining fitokimia, serta uji aktivitas antioksidan. Waktu penelitian ini yaitu April-Juni.

D. Pengumpulan Data

1. Cara Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan mengumpulkan sampel daun sungkai segar yang didapat di Kecamatan Gisting, Kabupaten Tanggamus. Kemudian sampel disortasi basah dan dirajang, lalu dilakukan pengeringan untuk membuat simplisia. Selanjutnya simplisia dihaluskan hingga didapatkan serbuk simplisia yang sudah halus. Sebagian serbuk simplisia yang sudah halus kemudian digunakan untuk identifikasi metabolit sekunder yang meliputi uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid/triterpenoid. Sedangkan, sisanya digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan dengan

cara dimaserasi dengan menggunakan etanol 96%, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* dan dilarutkan dengan etanol 96% untuk membuat larutan sampel saat pengujian aktivitas antioksidan.

2. Alat dan Bahan

a. Alat

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah blender, neraca analitik, inkubator, *vortex*, *spektrofotometer uv-vis*, kuvet, batang pengaduk, aluminium foil, erlenmeyer 250 ml, penangas air, cawan porselen 100 ml, gelas beaker 100 ml, labu ukur 10 ml, 50 ml, dan 100 ml, pipet volume 0,5 ml, 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml dan 5,0 ml, gelas ukur 10 ml dan 50 ml, pipet tetes kecil, botol kaca gelap, spatula, kertas saring, tabung reaksi, rak tabung reaksi, bulb, corong gelas, *rotary evaporator*, *waterbath*.

b. Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah daun sungkai, etanol 96%, asam klorida (HCl) 2 N, aquadest, pereaksi mayer, pereaksi bouchardat, pereaksi dragendrof, serbuk magnesium (Mg), asam klorida (HCl) pekat, amil alkohol (C₅H₁₂O), pereaksi besi (III) klorida (FeCl₃), n-heksan, asam asetat (CH₃COOH), asam sulfat (H₂SO₄) pekat, kristal DPPH, kuarsetin.

3. Prosedur Kerja Penelitian

a. Identifikasi Tanaman Sungkai (*Peronema canescens* J)

Sungkai (*Peronema canescens* J) tumbuh di tepi sungai yang lembab dan pada hutan terbuka. Tanaman ini ditemukan di Gisting, Kabupaten Tanggamus, Lampung. Identifikasi tanaman sungkai berdasarkan pada literatur Plant Resources of South-East Asia (Graaf, de. N.R; *et. al.* 1993: 346-347) dan Baumarten Von Java (Koorders, 1914). Identifikasi dengan melihat bagian-bagian tanaman berikut :

- 1) Bentuk batang
- 2) Bentuk daun
- 3) Bentuk akar

b. Pembuatan Simplisia Daun Sungkai (*Peronema canescens* J)

Berdasarkan penelitian Latief; dkk (2021) serta Fransisca, Kahanjak, dan Frethernety (2020), pembuatan simplisia daun sungkai (*Peronema canescens* J) dilakukan dengan cara berikut :

- 1) Diambil daun sungkai (*Peronema canescens* J) segar langsung dari pohonnya.
- 2) Dilakukan sortasi basah untuk memisahkan daun segar *Peronema canescens* J dari kotoran maupun benda asing.
- 3) Dicuci daun sungkai (*Peronema canescens* J) menggunakan air mengalir.
- 4) Dirajang daun sungkai (*Peronema canescens* J) untuk memperluas permukaan sampel supaya dapat kering ssecara merata.
- 5) Dikeringkan daun sungkai (*Peronema canescens* J) yang telah dirajang dengan cara diangin-anginkan.
- 6) Dilakukan sortasi kering daun sungkai (*Peronema canescens* J) untuk memisahkan simplisia dari benda-benda asing maupun kotoran.
- 7) Diperhalus simplisia daun sungkai (*Peronema canescens* J) menggunakan blender.
- 8) Diayak dengan pengayak nomor 60 mesh.

c. Skrining Fitokimia Alkaloid

Berdasarkan Marjoni (2016), pengujian alkaloid dapat dilakukan dengan cara berikut :

- 1) 0,5 g serbuk simplisia daun sungkai ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling.
- 2) Dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, dinginkan lalu disaring.
- 3) Gunakan filtrat dalam percobaan berikut :
 - a) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer. Hasil positif akan menghasilkan endapan berwarna putih/kuning.
 - b) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat. Hasil positif akan menghasilkan endapan berwarna coklat-hitam.
 - c) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendrof. Hasil positif akan menghasilkan endapan berwarna merah bata.

d) Sampel dianggap positif mengandung alkaloid apabila terjadi endapan paling sedikit dua dari tiga percobaan diatas.

d. Skrining Fitokimia Flavonoid

Berdasarkan Marjoni (2016), pengujian flavonoid dapat dilakukan dengan cara berikut:

- 1) 1 g serbuk simplisia daun sungkai ditambahkan 10 ml air panas, didihkan selama 5 menit dan saring dalam keadaan panas.
- 2) Diambil 5 ml filtrat lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg, 1 ml HCl pekat dan 2 ml amil alkohol.
- 3) Kocok dan biarkan memisah.
- 4) Sampel dianggap positif mengandung flavonoid apabila terbentuk warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol.

e. Skrining Fitokimia Tanin

Berdasarkan Marjoni (2016), pengujian tanin dapat dilakukan dengan cara berikut:

- 1) 0,5 g serbuk simplisia daun sungkai disari dengan menggunakan 10 ml aquadest, kemudian disaring.
- 2) Filtrat yang didapat diencerkan dengan aquadest hingga tidak berwarna.
- 3) 2 ml larutan yang sudah diencerkan kemudian ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida.
- 4) Sampel dianggap positif mengandung tanin apabila terbentuk warna biru atau hijau kehitaman pada larutan.

f. Skrining Fitokimia Saponin

Berdasarkan Marjoni (2016), pengujian saponin dapat dilakukan dengan cara berikut:

- 1) 0,5 g serbuk simplisia daun sungkai ditambahkan dengan 10 ml aquadest panas.
- 2) Dinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik.

- 3) Sampel dianggap positif mengandung saponin apabila terbentuk buih atau busa selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan buih atau busa tidak hilang jika ditambahkan 1 tetes larutan asam klorida 2 N.

g. Skrining Fitokimia Steroid dan Triterpenoid

Berdasarkan Marjoni (2016), pengujian steroid dan triterpenoid dapat dilakukan dengan cara berikut:

- 1) 1 g serbuk simplisia daun sungkai di maserasi dengan 20 ml n-heksan selama 2 jam kemudian disaring.
- 2) Uapkan filtrat menggunakan cawan penguap.
- 3) Setelah diuapkan, pada sisa ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat.
- 4) Sampel dianggap positif mengandung steroid apabila terbentuk warna biru hingga hijau dan dianggap positif mengandung triterpenoid apabila terbentuk warna merah hingga ungu.

h. Ekstraksi Simplisia Daun Sungkai

Berdasarkan penelitian Fadlilaturrahmah, dkk (2021) serta Ibrahim dan Hadi (2012) proses pengekstraksian simplisia daun sungkai (*Peronema canescens* J) dilakukan dengan metode maserasi yaitu sebagai berikut :

- 1) Sampel daun sungkai yang sudah dihaluskan direndam menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1 cm diatas permukaan rendaman serbuk atau dengan perbandingan sampel dan pelarut 1 : 5.
- 2) Maserasi dilakukan 3 x 24 jam disertai dengan pengadukan.
- 3) Maserat yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 58°C.

i. Uji Aktivitas Antioksidan

Berdasarkan Pindan; dkk (2021) dan Kiromah; dkk (2021), pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH yaitu sebagai berikut :

- 1) Pembuatan larutan DPPH 0,25 mM
 - a) Ditimbang kristal DPPH sebanyak 19,7 mg
 - b) Diukur etanol 96% sebanyak 200 ml

- c) Dilarutkan kristal DPPH dengan menggunakan etanol 96%
 - d) Homogenkan larutan dan simpan larutan dalam botol gelap
- 2) Pembuatan larutan sampel
 - a) Ditimbang ekstrak etanol daun sungkai sebanyak 40 mg
 - b) Larutkan dengan pelarut etanol 96% sebanyak 20 ml
 - c) Homogenkan dan letakkan dalam botol gelap
 - d) Dibuat larutan dengan variasi konsentrasi 10 ppm, 30 ppm, 50 ppm, dan 70 ppm
- 3) Pembuatan larutan blanko
 - a) Disiapkan tabung reaksi
 - b) Tambahkan etanol 96% sebanyak 1 ml
- 4) Pembuatan larutan kontrol
 - a) Diambil larutan DPPH sebanyak 1 ml
 - b) Ditambahkan dengan etanol 96% sebanyak 4 ml
 - c) Campur hingga sempurna
 - d) Inkubasi selama 30 menit
 - e) Ukur serapan menggunakan *spektrofotometer Uv-Vis* pada panjang gelombang 500-600 nm
- 5) Pembuatan Larutan Kuarsetin
 - a) Ditimbang kuarsetin sebanyak 1 mg
 - b) Dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 20 ml, homogenkan
 - c) Dibuat larutan dengan variasi konsentrasi 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, dan 4 ppm
- 6) Penentuan aktivitas antioksidan
 - a) Tambahkan larutan DPPH sebanyak 1 ml pada larutan sampel dan larutan kuarsetin
 - b) Homogenkan dengan menggunakan *vortex* dan inkubasi selama 30 menit
 - c) Amati warna larutan dan baca serapannya dengan menggunakan *spektrofotometer Uv-Vis* pada panjang gelombang 517 nm
 - d) Lakukan pengulangan sebanyak 3 kali

E. Pengolahan dan Analisis Data

Data-data hasil pengujian disajikan dalam bentuk tabel hasil penelitian berupa data yang diolah secara deskriptif kualitatif untuk mengetahui metabolit sekunder yang terdapat dalam daun sungkai, sedangkan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dalam daun sungkai data dianalisis dengan menggunakan persamaan regresi linear. Data diambil berdasarkan hasil yang terbentuk setelah sampel direaksikan dengan pereaksi kimia spesifik dan berdasarkan konsentrasi antioksidan dalam sampel dengan cara menghitung % inhibisi radikal bebas DPPH, dimana % inhibisi dapat dihitung dengan rumus berikut (Agustina, 2017) :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan :

- Abs kontrol : absorbansi larutan kontrol pada panjang gelombang 517 nm
- Abs sampel : absorbansi larutan uji atau larutan pembanding pada panjang gelombang 517 nm.

Selanjutnya, dibuat kurva hubungan antara konsentrasi (ppm) dan % inhibisi untuk menentukan nilai IC₅₀ yang akan dijadikan sebagai parameter aktivitas antioksidan. Nilai IC₅₀ yang diperoleh dari persamaan regresi linear yaitu dengan mengganti nilai y pada persamaan regresi linear dengan 50 sehingga akan didapat nilai x yang menunjukkan IC₅₀ sebagai bilangan yang menunjukkan konsentrasi larutan uji yang mampu menghambat aktivitas antiradikal sebesar 50% yang diperoleh dari persamaan berikut (Pindan; dkk, 2021:24) :

$$y = bx + a$$