

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan bersifat deskriptif yang akan dilakukan di laboratorium Kimia dengan menggunakan simplisia dan ekstrak etanol 96% daun kelor (*Moringa oleifera* L.) yang akan diuji aktivitas antioksidan. Adapun variabel penelitian diantaranya ekstrak simplisia daun kelor, senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid/triterpenoid, dan nilai IC₅₀.

B. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% daun kelor (*Moringa oleifera* L.) yang diperoleh dari Desa Merak Belantung, Kecamatan Kalianda, Kabupaten Lampung Selatan, Lampung.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang, penelitian ini akan dilaksanakan pada Januari – Mei 2024.

D. Pengumpulan Data

1. Cara Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan mengumpulkan sampel daun kelor yang diperoleh dari Desa Merak Belantung, Kecamatan Kalinda, Kabupaten Lampung Selatan. Kemudian sampel akan melalui beberapa proses sehingga menjadi simplisia kering dengan cara disortasi basah dan dirajang, lalu dilakukan pengeringan, kemudian simplisa kering dihaluskan hingga didapatkan serbuk simplisa. Selanjutnya dilakukan skrining fitokimia yang meliputi uji alkaloid menggunakan pereaksi *mayer*, *bauchardat*, dan *dragendrof*. Uji flavonoid menggunakan pereaksi amil alkohol menghasilkan lapisan amil alkohol yang

berwarna merah, kuning, atau jingga. Uji saponin menggunakan pereaksi HCl 2N menghasilkan buih atau busa. Uji tannin menggunakan pereaksi FeCl_3 menghasilkan warna hijau kehitaman. Uji steroid/triterpenoid menggunakan pereaksi H_2SO_4 menghasilkan warna biru atau hijau untuk steroid dan merah atau ungu untuk triterpenoid. Selanjutnya serbuk simplisia akan dilakukan ekstraksi menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 96%. Hasilnya akan diuapkan menggunakan *rotary evaporator*, kemudian ekstrak yang sudah kental dilarutkan dengan etanol 96% untuk dijadikan larutan sampel dan dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dengan pengulangan sebanyak tiga kali.

2. Alat dan Bahan

a. Alat

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah blender XS-685, *hot air sterilizer oven* YCO-010, neraca analitik *bel engienering*, ayakan mesh. 40, inkubator - *stream series*, *vortex mixer* VM-300P, *spektrofotometer UV-Vis* – 1900i with *Multi-cell sample Compartment*, kuvet, batang pengaduk, aluminium foil, erlenmeyer (250 ml), kompor listrik maspion, 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* DLAB RE100-Pro, plat tetes, *waterbath* CRWB-30.

b. Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah daun kelor, etanol 96%, asam klorida (HCl) 2N, aquadest, pereaksi Mayer, pereaksi Bouchardat, pereaksi Dragendrof, serbuk magnesium (Mg), asam klorida (HCl) pekat, amil alkohol ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$), pereaksi besi (III) klorida (FeCl_3), n-heksan, asam asetat (CH_3COOH), asam sulfat (H_2SO_4) pekat, kristal DPPH, kuersetin.

3. Prosedur Kerja Penelitian

a. Identifikasi Daun Kelor

Daun kelor (*Moringa oleifera* L.) dikumpulkan dari Desa Merak Belantung, Kecamatan Kalianda, Kabupaten Lampung Selatan. Identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Botani Unila, untuk mengetahui kebenaran dari sampel ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.).

b. Pembuatan Simplisia Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.)

Langkah pembuatan simplisia daun kelor adalah sebagai berikut:

- 1) Diambil daun kelor (*Moringa oleifera* L.) segar dari 3 batang tanaman kelor.
- 2) Daun kelor yang sudah dikumpulkan, selanjutnya dipisahkan dari ranting dan daun-daun yang kering atau daun yang kuning.
- 3) Setelah disortasi, tahap selanjutnya adalah pencucian. Pencucian dilakukan dengan menggunakan air mengalir.
- 4) Kemudian dilakukan pengeringan dengan memanfaatkan sinar matahari untuk menghilangkan air setelah proses pencucian, selanjutnya digunakan oven dengan suhu 50 °C selama 2 hari (Aprilina et al., 2020).
- 5) Setelah kering simplisia kembali disortir dari kotoran yang masih tersisa.
- 6) Tahap terakhir yaitu penghalusan simplisia dengan menggunakan blender.

c. Ekstraksi Simplisia Daun Kelor

Berdasarkan Marjoni (2016:41-42) proses pengekstraksian simplisia dengan metode maserasi adalah sebagai berikut:

- 1) Ditimbang serbuk simplisia daun kelor sebanyak 1.569 gram menggunakan neraca analitik (4 kali penimbangan).
- 2) Serbuk simplisia direndam menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 atau sebanyak 17 Liter.
- 3) Perendaman dilakukan selama 3 hari dan diaduk secara berulang tiap 5 jam. Setiap pengadukan dilakukan selama 5 menit.
- 4) Setelah masa perendaman selesai, maserat disaring dan dipisahkan dari ampasnya.
- 5) Kemudian ekstrak diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50 °C.

- 6) Lalu dikentalkan menggunakan waterbath dengan suhu 50 °C.
- 7) Ekstrak kental yang didapat disimpan dalam wadah ekstrak.

d. Skrining Fitokimia

1. Pemeriksaan Alkaloid

Menurut Marjoni (2016:8), pengujian alkaloid dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a) Diambil seujung spatula ekstrak etanol daun kelor lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi.
- b) Ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air suling, lalu panaskan di penangas air selama 2 menit.
- c) Didinginkan, lalu saring. Filtrat yang telah tersaring akan dipakai untuk percobaan berikut:
 - 1) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi *mayer*. Menghasilkan endapan putih / kuning.
 - 2) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi *bauchardat* menghasilkan endapan coklat.
 - 3) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi *dragendorf* menghasilkan endapan merah bata.
- d) Apabila terdapat endapan paling sedikit dengan 2 atau 3 pereaksi, maka sampel positif mengandung alkaloid.

2. Pemeriksaan Flavanoid

Menurut Marjoni (2016:9), pengujian flavonoid dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a) Diambil seujung spatula ekstrak etanol daun kelor, lalu dimasukkan kedalam beaker glass, lalu dtambahkan 100 mL air.
- b) Didihkan campuran tersebut sekitar kurang lebih 5 menit, saring filtrat dalam keadaan panas dengan bantuan corong glass dan kertas saring.
- c) Dipipet 5 mL filtrat, masukkan kedalam tabung reaksi, lalu tambahkan 0,1 gram serbuk Mg stearat, 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol, lalu dikocok, biarkan lapisannya memisah.

- d) Sampel positif mengandung flavonoid jika terbentuk lapisan amil alkohol yang berwarna merah, kuning, atau jingga.

3. Pemeriksaan Tanin

Menurut Marjoni (2016:10), pengujian tanin dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a) Ditimbang sampel ekstrak etanol daun kelor 1 g ditambahkan dengan 10 ml aquadest panas, diaduk dan disaring.
- b) Tambahkan 1 ml NaCl 10% pada filtrat, aduk rata lalu saring.
- c) Bagi filtrat menjadi 4 bagian (A, B, C, dan D).
- d) Filtrat A ditambahkan beberapa tetes gelatin, membentuk endapan.
- e) Filtrat B ditambahkan NaCl 10% dan gelatin 1% (sama banyak), membentuk endapan.
- f) Filtrat C ditambahkan 3 tetes larutan FeCl₃ 3%, membentuk larutan biru atau hijau.
- g) Filtrat D adalah sebagai blanko. Positif mengandung tanin apabila pada filtrat A dan B terbentuk endapan.

4. Pemeriksaan Saponin

Berdasarkan Marjoni (2016:12), pengujian saponin dapat dilakukan dengan cara berikut:

- a) Diambil seujung spatula ekstrak etanol daun kelor, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 10 mL air suling panas.
- b) Didinginkan kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik.
- c) Terbentuk buih atau busa selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10.
- d) Tambahkan 1 tetes larutan HCl₂N, apabila buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin.

5. Pemeriksaan steroida / triterpenoida

Menurut Marjoni (2016:12), pengujian steroida/triterpenoid dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a) Diambil seujung spatula ekstrak etanol daun kelor dimaserasi dengan 20 mL n-heksan selama 2 jam, lalu saring.

- b) Filtrat diuapkan dalam cawan penguap.
- c) Pada sisa filtrat, ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H₂SO₄.
- d) Hasil positif steroid apabila terbentuk warna biru atau hijau, sedangkan hasil positif triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna merah atau ungu.
- e. Uji Aktivitas Antioksidan

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

1. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM
 - 1) Ditimbang kristal DPPH sebanyak 1,971 mg.
 - 2) Diukur etanol *pro analysis* sebanyak 50 ml.
 - 3) Dilarutkan kristal DPPH dengan menggunakan etanol *pro analysis*.
 - 4) Homogenkan larutan dan simpan larutan dalam botol gelap.
2. Pembuatan larutan sampel
 - a) Ditimbang ekstrak etanol daun kelor sebanyak 40 mg.
 - b) Larutkan dengan pelarut etanol *pro analysis* sebanyak 20 ml.
 - c) Homogenkan dan letakkan dalam botol gelap.
 - d) Dibuat larutan dengan variasi konsentrasi masing-masing 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm.
3. Pembuatan Larutan Blanko
 - a) Disiapkan tabung reaksi
 - b) Tambahkan etanol *pro analysis* sebanyak 1-2 ml
4. Pembuatan Larutan Kontrol
 - a) Diambil larutan DPPH sebanyak 1 ml
 - b) Ditambahkan dengan etanol *pro analysis* 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 2,5 mg

- b) Dilarutkan dengan etanol *pro analysis* sebanyak 50 ml, homogenkan
- c) Dibuat larutan dengan variasi konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, dan 4 ppm
6. Penentuan Aktivitas Antioksidan
- a) Dipipet 4 ml dari masing masing konsentrasi ekstrak daun kelor dan kuarsetin.
- b) Ditambahkan 1 ml larutan DPPH, lalu campur hingga homogen menggunakan bantuan *vortex*.
- c) Diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap.
- d) Amati perubahan warna yang terjadi setelah proses inkubasi.
- e) Lalu, ukur nilai serapannya menggunakan *spektrofometer UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum (517 nm).
- f) Lakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

E. Analisis Data dan Penentuan Persen Inhibisi

1. Hidupkan *spektrofotometer UV-Vis* sesuai dengan prosedur.
2. Cari absorbansi larutan blanko, larutan sampel dan larutan pembanding pada panjang gelombang maksimum 517 nm, dengan cara klik menu “tambahan” lalu pilih abs/trans (untuk masing-masing larutan sampel dan larutan pembanding, diulang 3x untuk dicari rata-ratanya).
3. Setelah didapatkan absorbansi larutan blanko, sampel dan pembanding, selanjutnya dihitung % inhibisi menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

- Absorbansi kontrol = absorbansi larutan DPPH pada panjang gelombang maksimum (517 nm)
- Absorbansi sampel = absorbansi larutan uji atau larutan pembanding pada panjang gelombang maksimum (517 nm)

Diketahui bahwa bertambahnya konsentrasi ekstrak menyebabkan absorbansi sampel semakin menurun dan % inhibisi meningkat. Persen inhibisi meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi sampel dikarenakan semakin banyak senyawa pada sampel yang menghambat radikal bebas DPPH. Persen inhibisi (% aktivitas antioksidan) merupakan salah satu parameter yang menunjukkan kemampuan suatu antioksidan dalam menghambat radikal bebas. Parameter yang digunakan untuk mengetahui besarnya kemampuan senyawa sebagai antioksidan yaitu nilai IC_{50} .

F. Penentuan Nilai IC_{50}

Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi senyawa antioksidan yang dibutuhkan untuk menangkap radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Nilai IC_{50} dapat diperoleh dari persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi larutan (x) dengan % inhibisi (y). Konsentrasi sampel dihitung dengan nilai x yang diperoleh yaitu dengan cara memasukkan angka 50 sebagai y dalam persamaan regresi linier yang diperoleh dari grafik konsentrasi dengan % inhibisi (Hasanuddin, 2023).

$$y = ax + b$$

Keterangan:

- $y = 50$
- $x =$ konsentrasi larutan uji (K)