

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan bersifat eksperimental dengan menggunakan serbuk simplisia buah Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) yang akan diidentifikasi kandungan metabolit sekunder dan ekstrak buah Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) yang akan diuji aktivitas antioksidan. Adapun variabel penelitian diantaranya senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid/triterpenoid, organoleptis ekstrak buah Cabai Jawa, dan nilai IC₅₀.

B. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah serbuk simplisia dan ekstrak buah Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) yang telah diekstraksi menggunakan metode soxhletasi dan maserasi.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang untuk melakukan proses identifikasi tanaman, proses ekstraksi, identifikasi metabolit sekunder, serta uji aktivitas antioksidan. Adapun waktu pelaksanaan penelitian ini yaitu Januari - Mei 2023.

D. Pengumpulan Data

1. Cara Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan mengumpulkan sampel buah Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) matang yang sudah mencapai stadium tua ditandai dengan warna hijau kekuningan sampai kemerahan. Sampel diperoleh dari tanaman budidaya Jurusan Farmasi Poltekkes Tanjungkarang dan akan melalui beberapa proses hingga menjadi serbuk simplisia kering. Sebagian serbuk simplisia akan dilakukan identifikasi terhadap kandungan

metabolit sekunder berupa senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid/triterpenoid. Sedangkan sisa serbuk simplisia akan melalui tahap ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% dengan 2 metode ekstraksi yaitu soxhletasi dan maserasi. Hasil ekstraksi akan diuapkan menggunakan *rotary evaporator*, selanjutnya ekstrak yang sudah kental akan dilarutkan menggunakan etanol *pro analysis* untuk dijadikan larutan sampel dan diuji aktivitas antioksidannya.

2. Alat dan Bahan

a. Alat

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah blender, oven, neraca analitik, ayakan mesh no. 40, inkubator, *vortex*, *spektrofotometer Visible*, kuvet, batang pengaduk, aluminium foil, erlenmeyer (250 mL), alat soxhlet, kompor listrik, cawan porselen (100 mL), *beaker glass* (100 mL), labu ukur (10 mL, 50 mL, dan 100 mL), pipet volume (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, tali kasur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, bulb, corong gelas, *rotary evaporator*, plat tetes.

b. Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah buah Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl), etanol 70%, etanol *pro analysis*, asam klorida (HCl) 2N, aquadest, pereaksi mayer, pereaksi *bouchardat*, pereaksi *dragendrof*, serbuk magnesium stearat (Mg), asam klorida (HCl) pekat, amil alkohol (C₅H₁₂O), pereaksi besi (III) klorida (FeCl₃), n-heksan, asam asetat (CH₃COOH), asam sulfat (H₂SO₄) pekat, kristal DPPH, kuersetin.

3. Prosedur Kerja Penelitian

a. Identifikasi Tanaman Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl)

Tanaman Cabai Jawa merupakan tumbuhan dengan batang memanjat, melilit atau melata. Daun berbentuk bundar telur sampai lonjong, pangkal daun berbentuk jantung atau membulat, ujung daun runcing, bintik-bintik kelenjar terdapat tenggelam di permukaan bawah; panjang helai daun 8,5 cm sampai 30 cm, lebar helai daun 3 cm sampai 13 cm, panjang tangkai daun 0,5 cm sampai 3 cm. Perbungaan berupa bulir yang tegak atau sedikit merunduk,

bergagang 0,5 cm sampai 2 cm, daun gagang (*bractea*) berbentuk bundar telur, panjang 1,5 mm sampai 2 mm, berwarna kuning waktu antesis, melekat pada gagang hanya pada satu titik saja; bulir jantan, panjang 2,5 sampai 8,5 cm; benangsari 2 kadang-kadang 3, pendek; bulir betina, panjang 1,5 cm sampai 3 cm; putik sejumlah 2 sampai 3 buah. Buah berbentuk bulat, berwarna merah cerah, biji berukuran 2 mm sampai 2,5 mm (Depkes RI, 1995). Identifikasi bagian-bagian tanaman buah Cabai Jawa meliputi:

- 1) Bagian akar
 - 2) Bagian batang
 - 3) Bagian daun
 - 4) Bagian buah
- b. Pembuatan Simplisia Buah Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl)
- Langkah pembuatan simplisia buah Cabai Jawa adalah sebagai berikut:
- 1) Diambil buah Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) segar dari batangnya.
 - 2) Buah Cabai Jawa yang sudah dikumpulkan, selanjutnya dipisahkan dari kotoran yang menempel, lalu dicuci bersih.
 - 3) Setelah dicuci, tahap selanjutnya adalah pengeringan. Pengeringan simplisia dapat dilakukan menggunakan oven dengan suhu 50 °C. Setelah kering, simplisia kembali disortir dari kotoran yang masih tersisa.
 - 4) Tahap terakhir yaitu simplisia di blender. Selanjutnya serbuk simplisia perlu diayak untuk mendapatkan serbuk simplisia yang halus.
- c. Pemeriksaan Alkaloid
- Menurut Marjoni (2016:8), pengujian alkaloid dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:
- 1) Ditimbang 0,5 gram serbuk simplisia buah Cabai Jawa.
 - 2) Ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air suling, lalu panaskan dengan suhu 100 °C di penangas air selama 2 menit.
 - 3) Didinginkan, lalu saring. Filtrat yang telah tersaring akan dipakai untuk percobaan berikut:
 - Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer. Akan menghasilkan endapan putih/kuning.

- Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi *bouchardat* menghasilkan endapan coklat.
 - Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi *dragendrof* menghasilkan endapan merah bata.
- 4) Apabila terdapat endapan paling sedikit dengan 2 atau 3 pereaksi, maka sampel positif mengandung alkaloid.

d. Pemeriksaan Flavonoid

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

- 1) Ditimbang 10 gram serbuk simplisia Cabai Jawa, lalu tambahkan 100 mL air.
- 2) Didihkan campuran tersebut pada suhu 100 °C sekitar kurang lebih 5 menit, kemudian saring filtrat dalam keadaan panas.
- 3) Dipipet 5 mL filtrat, lalu tambahkan 0,1 gram serbuk Mg stearat, 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol, lalu dikocok, biarkan lapisannya memisah.
- 4) Sampel positif mengandung flavonoid jika terbentuk lapisan amil alkohol yang berwarna merah, kuning, atau jingga.

e. Pemeriksaan Tanin

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

- 1) Sebanyak 0,5 gram sampel diekstrak menggunakan 10 mL aquades.
- 2) Hasil ekstraksi disaring kemudian filtrat diencerkan dengan aquades sampai tidak berwarna.
- 3) Diambil 2 mL filtrat yang telah diencerkan, kemudian tambahkan 1-2 tetes FeCl_3 .
- 4) Hasil positif sampel mengandung tanin, ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman.

f. Pemeriksaan Saponin

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

- 1) Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 10 mL air suling panas.
- 2) Didinginkan kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik.

- 3) Terbentuk buih atau busa selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10.
- 4) Tambahkan 1 tetes larutan HCl 2N, apabila buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin.

g. Pemeriksaan steroid/triterpenoid

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

- 1) Sebanyak 1 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 20 mL n-heksan selama 2 jam, lalu saring.
- 2) Filtrat diuapkan dalam cawan penguap
- 3) Pada sisa filtrat, ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H₂SO₄.
- 4) Hasil positif steroid apabila terbentuk warna biru atau hijau, sedangkan hasil positif triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna merah atau ungu.

h. Ekstraksi Simplisia Buah Cabai Jawa

1) Metode Soxhletasi

Berdasarkan Istiqomah (2013:21), proses pengestraksian serbuk simplisia dengan metode soxhletasi adalah sebagai berikut:

- a) Sejumlah serbuk simplisia dibungkus dengan kertas saring dan diikat menggunakan tali kasur, setelah itu masukkan ke dalam alat soxhlet.
- b) Ukur pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:5, lalu masukkan ke dalam labu alas bulat.
- c) Proses ekstraksi dilakukan dengan suhu 70 °C sampai tetesan siklus tidak berwarna lagi atau kurang lebih 5 jam.
- d) Kemudian ekstrak diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50 °C.

2) Metode Maserasi

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

- a) Serbuk simplisia direndam menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:7.
- b) Perendaman dilakukan selama 5 x 24 jam dan diaduk secara berulang.
- c) Setelah masa perendaman selesai, maserat disaring dan dipisahkan dari ampasnya.

d) Kemudian ekstrak diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50 °C.

i. Uji Aktivitas Antioksidan

Berdasarkan Pindan *et al* (2021) dan Hasan; dkk (2022), pengujian antioksidan dengan metode DPPH dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1) Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM
 - a) Ditimbang sebanyak 1,971 mg kristal DPPH.
 - b) Kristal DPPH dilarutkan dalam 50 mL etanol *pro analysis*.
 - c) Homogenkan larutan DPPH, lalu simpan dalam botol gelap.
- 2) Pembuatan Larutan Sampel
 - a) Ditimbang 40 mg ekstrak etanol buah Cabai Jawa.
 - b) dilarutkan dalam 20 mL pelarut etanol *pro analysis*.
 - c) Homogenkan sampel, lalu simpan dalam botol gelap.
 - d) Buat variasi konsentrasi ekstrak etanol buah Cabai Jawa masing-masing 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm.
- 3) Pembuatan Larutan Kuersetin
 - a) Ditimbang sebanyak 2,5 mg kuersetin.
 - b) Kemudian dilarutkan dalam 50 mL pelarut etanol *pro analysis*.
 - c) Homogenkan sampel, lalu simpan dalam botol gelap.
 - d) Dibuat variasi konsentrasi berturut-turut 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm dan 8 ppm.
- 4) Pembuatan Larutan Blanko
 - a) Disiapkan tabung reaksi
 - b) Tambahkan 1-2 mL etanol *pro analysis*
- 5) Pembuatan Larutan Kontrol
 - a) Disiapkan tabung reaksi.
 - b) Dipipet 1 mL larutan DPPH.
 - c) Lalu tambahkan etanol *pro analysis* sebanyak 4 mL, campur hingga homogen dan diinkubasi selama 30 menit.
 - d) Ukur serapannya dengan menggunakan *spektrofotometer Visible* dengan panjang gelombang 500-600 nm hingga didapatkan panjang gelombang maksimum.

- 6) Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH
 - a) Dipipet 4 mL dari masing-masing konsentrasi ekstrak buah Cabai Jawa dan kuersetin.
 - 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 Visible* pada panjang gelombang maksimum.
 - f) Lakukan pembacaan absorbansi sebanyak 3 kali.

E. Pengolahan dan Analisis Data

Data-data hasil penelitian akan disajikan dalam bentuk tabel hasil penelitian berupa data yang diolah secara deskriptif kualitatif untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung dalam buah Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl), sedangkan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dalam ekstrak buah Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl), data dianalisis menggunakan persamaan regresi linear. Persamaan regresi linear dibuat dengan menghubungkan persen inhibisi terhadap berbagai konsentrasi larutan uji. Setelah diperoleh persamaan regresi linear, peneliti dapat menghitung nilai IC_{50} sebagai hasil akhir pada pengamatan aktivitas antioksidan dan dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

- $y = 50$
- $x =$ konsentrasi larutan uji