

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium yang merupakan penelitian eksperimental dengan adanya perlakuan sebanyak 5 konsentrasi pada sampel, dan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Penelitian ini menggunakan simplisia daun salam dan ekstrak etanol daun salam yang akan dilakukan dengan uji pereaksi kimia. Variabel yang akan digunakan penelitian ini adalah ekstrak simplisia daun salam, senyawa alkaloid, flavanoid, saponin, tanin, fenolik, steroid atau triterpenoid, dan nilai IC₅₀.

B. Subjek Penelitian

Subjek dari penelitian ini merupakan ekstrak daun salam (*Syzygium Polyanthum (Wight) Walp*) yang diperoleh dari daerah Pesisir Barat.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Untuk lokasi penelitian ini akan dilaksanakan di Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang di Laboratorium Kimia Farmasi, Farmakognosi, dan Ruang Instrumen yang akan dilakukan identifikasi tanaman, melakukan proses ekstraksi, skrining fitokimia, dan juga uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan April-Juni tahun 2023.

D. Pengumpulan Data

1. Cara pengumpulan data

Dikumpulkan sampel daun salam yang di dapatkan dari daerah Pesisir Barat. Kemudian setelah dikumpulkan untuk pembuatan sampel daun salam dilakukan sortasi basah, lalu dilakukan pengeringan, setelah pengeringan dilakukan sortasi kering dan sampel daun salam dihaluskan sehingga menjadi serbuk simplisia. Sebagian serbuk simplisia yang halus digunakan untuk identifikasi fitokimia yaitu, uji senyawa alkaloid,

flavonoid, saponin, tanin, fenolik, steroid dan triterpenoid. Sebagian simplisia serbuk daun salam digunakan untuk uji aktivitas antioksidan dengan metode soxhlet menggunakan etanol 96% yang akan di uapkan dengan alat *waterbath* lalu dilarutkan dengan etanol p.a untuk pembuatan larutan sampel saat pengujian aktivitas antioksidan.

2. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu blender, neraca analitik, inkubator, *vortex*, *spektrofotometer uv-vis*, batang pengaduk, kuvet, aluminium foil, penangas air, spatula, kertas saring, bulb, *waterbath*, rak tabung reaksi, dan peralatan gelas yang umum di laboratorium yaitu tabung reaksi, corong gelas, botol kaca gelap, pipet tetes kecil, pipet tetes volume, beaker glass 100 ml, erlenmeyer 250 ml, labu ukur 10 ml, 50 ml, dan 100 ml, cawan porselen 100 ml, gelas ukur 10 ml dan 50 ml.

b. Bahan

Bahan yang akan digunakan pada penelitian ini adalah daun salam yang diambil dari daerah Pesisir Barat, etanol 96%, etanol p.a, pereaksi mayer, bouchardat, dragendrof untuk uji alkaloid, asam klorida (HCl) P, serbuk magnesium (Mg), aquadest, pereaksi besi (III) klorida (FeCl₃), pereaksi asam klorida (HCl) 2N, n-heksan, asam asetat (CH₃COOH), asam sulfat (H₂SO₄), kuarsetin, kristal DPPH.

3. Prosedur Kerja Penelitian

a. Identifikasi Tanaman Daun Salam

Daun Salam adalah daun *Syzygium polyanthum (Wight) Walp.*

Pemerian : Bau aromatik lemah; rasa kelat.

Mokroskopik : Daun tunggal bertangkai pendek, panjang tangkai daun 5 mm sampai 10 mm. Helai Daun berbentuk corong memejang, panjang 7 cm sampai 15 cm, lebar 5 cm sampai 10 cm, ujung dan pangkal daun meruncing, tepi rata, permukaan atas berwarna coklat kehijauan, licin, mengkilat, permukaan bawah berwarna coklat tua, tulang daun menyirip dan menonjol pada permukaan bawah, tulang cabang halus.

Mikroskopik : Epidermis atas terdiri dari satu lapis sel berbentuk persegi panjang, dinding empat panjang, dinding tebal, kutikula tebal, pada pengamatan tangensial dinding samping berkelok-kelok, kutikula jelas bergaris. Sel epidermis bawah lebih kecil dari pada epidermis atas, dinding tipis, kutikula tebal, pada pengamatan tangensial dinding samping lebih berkelok-kelok. Stomata tipe parasitik, hanya terdapat pada epidermis bawah.

Serbuk : Warna coklat, fragmen pengenal adalah fragmen epidermis atas dengan kutikula bergaris; fragmen epidermis bawah; hablur kalsium oksalat bentuk roset, lepas atau dalam mesofil; fragmen berkas pembuluh, fragmen serabut sklerenkim (Materia, 1980:111).

b. Pembuatan Simplisia Daun Salam

Berdasarkan penelitian Ginanjar (2021), pembuatan simplisia daun salam (*Syzygium polyanthum (Wight) Walp*) dilakukan dengan cara :

- 1) Diambil daun salam yang segar
- 2) Dilakukan sortasi basah untuk memisahkan daun salam segar dari kotoran atau benda asing lainnya
- 3) Dilakukan pencucian daun salam dengan menggunakan air yang mengalir untuk menghilangkan tanah dan kotoran lainnya yang melekat pada simplisia
- 4) Dilakukan perajangan daun salam agar dapat memperluas permukaan sampel dan supaya sampel bisa kering secara merata
- 5) Dilakukan pengeringan pada daun salam yang sudah dirajang dikeringkan di udara yang terbuka
- 6) Dilakukan sortasi kering daun salam untuk memisahkan simplisia benda asing dan kotoran lainnya yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering
- 7) Dihaluskan simplisia daun salam dengan blender sampai menjadi serbuk simplisia
- 8) Diayak simplisia yang sudah diblender kemudian disimpan pada wadah tertutup

c. Ekstraksi Simplisia Daun Salam

Berdasarkan buku Cartika, Harpolia (2017), dan penelitian Kuntorini; dkk (2018), proses ekstrak simplisia daun salam (*Syzygium polyanthum (Wight) Walp*) dilakukan dengan menggunakan metode soxhlet yaitu :

- 1) Serbuk simplisia daun salam dibungkus dengan kertas saring, lalu kertas saring yang berisi sampel tersebut diikat kuat
- 2) Dimasukan kertas saring berisi sampel kedalam alat ekstraksi soxhlet
- 3) Dimasukan pelarut etanol 96% kedalam labu penampung atau labu bulat, lalu alat ekstraksi soxhletasi dirangkai dengan kondensor
- 4) Ekstrak yang didapatkan kemudian dipekatkan dengan waterbath hingga menghasilkan ekstrak pekat

d. Skrining Fitokimia Alkaloid

- 1) Simplisia ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling
- 2) Dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, lalu dinginkan dan disaring
- 3) Filtrat dipakai untuk percobaan berikut :
 - a) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer menghasilkan endapan putih atau kuning
 - b) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambah 2 tetes pereaksi bouchardat menghasilkan endapan coklat-hitam
 - c) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambah 2 tetes pereaksi Dragendrof menghasilkan endapan merah bata
- 5) Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau paling sedikit dua atau tiga dari percobaan diatas

e. Skrining Fitokimia Flavonoid

- 1) Sebanyak 10 gr serbuk simplisia daun salam lalu ditambah 100 ml air panas, kemudian didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas
- 2) Diambil filtrat 5 ml yang diperoleh kemudian ditambahkan 0,1 gr serbuk Mg, 1 ml HCL pekat dan 2 ml amil alkohol, lalu dikocok dan dibiarkan memisah

- 3) Flavonoid dianggap positif jika terjadi warna merah, kuning, dan jingga pada lapisan amil alkohol
- f. Skrining Fitokimia Tanin
- 1) Diambil 0,5 gr sampel disari dengan 10 ml air suling, lalu disaring
 - 2) Kemudian filtrat diencerkan dengan air suling sampai tidak bewarna
 - 3) Diambil larutan yang sudah diencerkan sebanyak 2 ml, lalu ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida (FeCl_3)
 - 4) Tanin dianggap positif jika terbentuk warna biru atau hijau kehitaman
- g. Skrining Fitokimia Saponin
- 1) Sampel sebanyak 0,5 gr dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air suling panas
 - 2) Didinginkan lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik terbentuk buih atau busa yang selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm
 - 3) Saponin dianggap positif jika pada penambahan 1 tetes larutan asam klorida 2 N apabila buih tidak hilang selama 10 menit
- h. Skrining Fitokimia Steroid dan Triterpenoid
- 1) Sampel sebanyak 1 gr dimaserasi dengan 20 ml n-heksan selama 2 jam, lalu disaring
 - 2) Filtratnya diuapkan dalam cawan penguap
 - 3) Pada sisa penguapan ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat
 - 4) Kemudian diamati warna yang timbul hingga perubahan warnanya
 - 5) Steroid dan triterpenoid dianggap positif apabila dengan timbulnya warna ungu atau merah kemudian berubah menjadi hijau biru
- i. Skrining Fitokimia Fenolik
- 1) Sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air suling
 - 2) Dikocok perlahan dan dibiarkan memisah
 - 3) Diambil larutan dan ditambahkan 2-3 tetes pereaksi FeCl_3
 - 4) Fenolik dianggap positif jika pada penambahan FeCl_3 jika terbentuk warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam pekat

j. Uji Aktivitas Antioksidan

Berdasarkan penelitian Ginanjar (2021), pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH yaitu sebagai berikut :

- 1) Pembuatan Larutan DPPH
 - a) Larutan DPPH yang akan digunakan dengan cara menimbang kristal DPPH sebanyak 5 mg
 - b) Dilarutkan dalam pelarut etanol p.a sebanyak 100 ml
 - c) Larutan dihomogenkan dan larutan disimpan dalam botol gelap
- 2) Pembuatan Larutan Sampel
 - a) Ditimbang sebanyak 10 mg ekstrak etanol daun salam
 - b) Kemudian dilarutkan dengan pelarut etanol p.a sebanyak 10 ml
 - c) Sampel dihomogenkan dan diletakkan dalam botol gelap
 - d) Disiapkan tabung reaksi untuk masing-masing variasi konsentrasi ekstrak etanol yaitu 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, dan 300 ppm
- 3) Pembuatan Larutan Blanko
 - a) Disiapkan tabung reaksi
 - b) Lalu ditambahkan etanol p.a sebanyak 1 ml
- 4) Pembuatan Larutan Kontrol
 - a) Larutan DPPH diambil sebanyak 1 ml
 - b) Kemudian ditambah dengan etanol p.a sebanyak 4 ml
 - c) Larutan dicampur hingga sempurna
 - d) Diinkubasi selama 30 menit
 - e) Serapan diukur dengan menggunakan *spektrofotometer uv-vis* pada panjang gelombang 500-600 nm
- 5) Pembuatan Larutan Kuersetin
 - a) Kuersetin ditimbang sebanyak 2 mg
 - b) Dilarutkan dengan pelarut etanol p.a sebanyak 10 ml
 - c) Dihomogenkan
 - d) Dibuat larutan menjadi beberapa variasi konsentrasi berturut-turut 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm

- 6) Penentuan Aktivitas Antioksidan
 - a) Pada larutan kuarsetin dan larutan sampel ditambahkan larutan DPPH sebanyak 1 ml
 - b) Kemudian dihomogenkan dengan *vortex* dan diinkubasi selama 30 menit
 - c) Warna larutan diamati dan dibaca serapannya dengan menggunakan *spektrofotometer visible* pada panjang gelombang 517 nm.
 - d) Lakukan pengulangan sebanyak 3 kali
 - e) Pengerjaan dilakukan dalam ruangan yang terhindar dari cahaya matahari

E. Pengolahan dan Analisis Data

Aktivitas antioksidan di ukur dengan menggunakan *spektrovotometer UV-Vis*, kemudian data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel. Parameter yang biasa digunakan untuk menginterpretasikan hasil dari uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH adalah dengan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi yang menyebabkan hilangnya 50% aktivitas DPPH (Molyneux, 2004). Untuk menghitung nilai IC_{50} diperlukan data persen inhibisi dari pengujian yang dilakukan. Persen inhibisi dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Keterangan :

Absorbansi Blanko : Serapan radikal DPPH (blanko) dalam etanol pada panjang gelombang maksimum yang telah ditetapkan.

Absorbansi sampel : Serapan sampel dalam radikal DPPH pada panjang gelombang maksimum yang telah ditetapkan (Annur, 2022:39).

Konsentrasi sampel dan persen inhibisi yang diperoleh diplot masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dari masing-masing sampel dinyatakan dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai IC_{50} (Fathurrachman, 2014:20-21).