

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dikerjakan di laboratorium kimia jurusan farmasi, Politeknik Kesehatan Tanjungkarang yang bersifat eksperimental menggunakan ekstrak metanol 70% daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) yang akan dilaksanakan identifikasi senyawa fitokimia serta uji aktivitas antioksidan.

B. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini ialah ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) yang sudah di ekstraksi secara metode maserasi dalam pelarut metanol 70%. Daun cengkeh yang digunakan berasal dari Kecamatan Baradatu, Kabupaten Way Kanan Dan sudah dilakukan identifikasi tumbuhan pada penelitian sebelumnya (Tamatantri, 2023).

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang untuk ekstraksi, identifikasi senyawa fitokimia, serta uji aktivitas antioksidan. Penelitian ini akan dilaksanakan pada Desember – Mei 2024.

D. Pengumpulan Data

1. Cara Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilaksanakan melalui pengambilan sampel daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) yang masih segar dan Sampel tersebut kemudian dengan berbagai tahap sampai menjadi serbuk simplisia kering. Setelah itu, serbuk simplisia diekstraksi secara metode maserasi dalam pelarut metanol 70%. Filtrat hasil ekstraksi diuapkan melalui *rotary evaporator* serta dikentalkan dengan waterbath. Kemudian didapatkan ekstrak kental, lalu dilakukan identifikasi organoleptis dan identifikasi kandungan fitokimia untuk mendeteksi senyawa seperti alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, steroid, dan

triterpenoid. Ekstrak yang dihasilkan kemudian dilarutkan menggunakan metanol *pro analysis* untuk persiapan uji aktivitas antioksidan.

2. Aat dan Bahan

a. Alat

Dalam penelitian ini, peralatan yang dibutuhkan antara lain blender XS-685, oven sterilizer udara panas YCO-010, neraca analitik Bel Engineering, ayakan mesh nomor 40, *rotary evaporator* DLAB RE100-Pro, waterbath CRWB-30, kompor listrik Maspion, vortex mixer VM-300P, inkubator - Stream Series, spektrofotometer UV-Vis 1900i dengan Multi-cell Sample Compartment, kuvet, batang pengaduk, spatula, aluminium foil, beaker glass (100 mL, 250 mL, 500 mL), gelas ukur (10 mL dan 50 mL), erlenmeyer (250 mL), rak tabung reaksi, tabung reaksi, bulb, corong gelas, kertas saring, cawan porselen (100 mL), plat tetes, pipet ukur (1,0 mL, 2,0 mL, 3,0 mL, 4,0 mL, 5,0 mL, 20,0 mL), pipet tetes kecil, labu ukur (10 mL, 25 mL, 50 mL, dan 100 mL), serta botol kaca gelap.

b. Bahan

Dalam penelitian ini, bahan-bahan yang dibutuhkan meliputi daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) metanol 70%, serbuk magnesium stearat (Mg), amil alkohol ($C_5H_{12}O$), asam klorida (HCl) pekat, asam klorida (HCl) 2N, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, pereaksi Bouchardat, aquadest, n-heksan, asam sulfat (H_2SO_4) pekat, pereaksi besi (III) klorida ($FeCl_3$), asam asetat (CH_3COOH), kuersetin, kristal DPPH, dan metanol *pro analysis*.

3. Prosedur Kerja Penelitian

a. Identifikasi Tanaman

Identifikasi tanaman dilaksanakan untuk memastikan keakuratan sampel yang dipakai pada penelitian. Proses identifikasi tanaman daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dilaksanakan secara peencocokkan ciri-ciri morfologis tanaman tersebut dengan referensi atau literatur yang tersedia. Hal ini bertujuan untuk menghindari kesalahan pada pengumpulan bahan yang ingin dipakai pada penelitian.

b. Pembuatan Simplisia Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) (Depkes RI, 1985)

- 1) Sebanyak 3 kg daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) ditimbang.
- 2) Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan daun cengkeh segar dari kotoran serta benda asing.
- 3) Melakukan pencucian daun cengkeh menggunakan air yang mengalir.
- 4) Daun cengkeh lalu dilakukan perajangan guna membuat ukurannya lebih kecil.
- 5) Daun cengkeh yang sudah dilakukan perajangan ditempatkan di atas nampan, ditutup dengan kain hitam, dan dilakukan penjemuran di bawah sinar matahari sampai kering.
- 6) Sesudah kering, dilakukan proses sortasi agar menyeleksi simplisia dari benda asing atau kotoran.
- 7) Simplisia daun cengkeh lalu dilakukan penghalusan menggunakan blender.
- 8) Serbuk simplisia yang dihasilkan diayak melalui ayakan nomor 40.

c. Ekstraksi Simplisia Daun Cengkeh

Marjoni (2016:41-42) menyatakan bahwa prosedur berikut dapat digunakan dalam ekstraksi serbuk simplisia menggunakan metode maserasi:

- 1) Timbang 720 gram serbuk simplisia daun (*Syzygium aromaticum* L.) menggunakan neraca analitik.
- 2) Masukkan serbuk simplisia yang sudah ditimbang ke wadah gelap atau wadah tertutup.
- 3) Rendam serbuk simplisia dengan 5.040 ml pelarut metanol 70%.
- 4) Tutup wadah menggunakan aluminium foil dan biarkan di tempat bebas cahaya selama tiga hari, sembari dilakukan pengadukkan tiap 12 jam hingga ± 5 menit setiap pengadukan.
- 5) Setelah perendaman selesai, saring maserat maserasi dan pisahkan dari ampasnya.
- 6) Ampas sisa maserasi digunakan untuk proses remaserasi dengan merendamnya menggunakan 2.160 ml pelarut metanol 70% selama dua hari, sembari dilakukan pengadukkan tiap 12 jam hingga ± 5 menit setiap pengadukan.
- 7) Saring kembali maserat hasil remaserasi, pisahkan dari ampasnya, lalu satukan dengan filtrat hasil maserasi.
- 8) Filtrat lalu dilakukan penguapan serta dilakukan pemekatan di suhu 50°C melalui *rotary evaporator*.

- 9) Dilanjutkan dengan proses pengentalan menggunakan waterbath pada suhu 50°C.
- 10) Ekstrak yang diperoleh dimasukkan ke dalam wadah ekstrak, kemudian ditimbang.
- 11) Setelah itu, rendemen ekstrak dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100\%$$

d. Identifikasi Organoleptis

Uji organoleptik ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dikerjakan melalui pengenalan menggunakan panca indera untuk mengidentifikasi beberapa karakteristik, seperti warna (hijau tua, coklat, kuning, dan lain-lain), bentuk (padat, kental, cair, dan sebagainya), serta bau (aromatik, tidak berbau, dan lain-lain).

e. Identifikasi Senyawa Fitokimia

1. Uji Flavonoid

Marjoni (2016:9) menjelaskan bahwa untuk mendeteksi kandungan flavonoid, dapat dilakukan prosedur berikut:

- a) Timbang 10 gram ekstrak daun cengkeh menggunakan neraca analitik, lalu tambahkan 100 mL air.
- b) Didihkan campuran tersebut hingga ± 5 menit menggunakan kompor listrik, lalu saring filtrat menggunakan kertas saring pada kondisi panas.
- c) Pipet 5 mL filtrat menggunakan pipet ukur, kemudian dilakukan penambahan 0,1 gram bubuk Mg stearat, 1 mL HCl pekat, serta 2 mL amil alkohol. Dilakukan pengocokkan campuran sampai homogen lalu diamkan hingga terbentuk lapisan yang memisah.
- d) Ketika lapisan amil alkohol menampilkan warna merah, kuning, maupun jingga, artinya sampel positif mengandung senyawa flavonoid.

2. Uji Saponin

Marjoni (2016:12) menjelaskan bahwa untuk mendeteksi kandungan saponin, dapat dilakukan dengan prosedur berikut:

- a) Timbang 0,5 gram ekstrak daun cengkeh, lalu masukkan ke tabung reaksi, dan dilakukan penambahan 10 mL air suling panas.
- b) Diamkan larutan hingga dingin, lalu dikocok kuat-kuat hingga 10 detik.
- c) Jika dalam waktu 10 menit terbentuk busa atau buih dengan tinggi 1-10 cm, tambahkan 1 tetes larutan HCl 2N.
- d) Kandungan saponin ditandai dengan adanya buih yang tidak hilang, dengan tinggi buih tidak kurang dari 1 cm.

3. Uji Alkaloid

Marjoni (2016:8) mengatakan bahwa, untuk mendeteksi kandungan alkaloid, bisa dengan prosedur berikut:

- a) Timbang 0,5 gram ekstrak daun cengkeh.
- b) Tambahkan 9 mL air suling serta 1 mL HCl 2N, lalu panaskan larutan tersebut dalam 2 menit di penangas air.
- c) Diamkan hingga larutan dingin, kemudian saring menggunakan kertas saring. Filtrat hasil penyaringan akan digunakan untuk langkah berikut:
 - Ambil 3 tetes filtrat, dilakukan penambahan 2 tetes pereaksi Mayer. Endapan putih atau kuning akan terbentuk.
 - Ambil 3 tetes filtrat, dilakukan penambahan 2 tetes pereaksi Bouchardat. Endapan coklat akan terbentuk.
 - Ambil 3 tetes filtrat, dilakukan penambahan 2 tetes pereaksi Dragendorff. Endapan merah bata akan terbentuk.
- d) Sampel dianggap positif mengandung alkaloid jika setidaknya 2 atau 3 pereaksi menghasilkan endapan.

4. Uji Fenolik

Marjoni (2016:10) menyatakan bahwa untuk mendeteksi kandungan tanin, dapat dilakukan dengan prosedur berikut:

- a) Timbang 0,5 gram ekstrak daun cengkeh, lalu ekstraksi dengan 10 mL aquades.
- b) Saring hasil ekstraksi menggunakan kertas saring, kemudian encerkan filtrat dengan aquades hingga tidak berwarna.
- c) Ambil 2 mL filtrat yang sudah dilakukan pengenceran, lalu dilakukan penambahan 1-2 tetes larutan FeCl_3 .

- d) Jika muncul warna hijau kehitaman, ini menandakan terdapat kandungan senyawa tanin.

5. Uji Steroid/Triterpenoid

Marjoni (2016:12) menjelaskan bahwa untuk mendeteksi kandungan steroid/triterpenoid, tahapan yang bisa diterapkan ialah seperti berikut:

- a) Timbang 1 gram ekstrak daun cengkeh dengan neraca analitik, kemudian dilakukan proses maserasi hingga 2 jam dengan 20 mL n-heksan, lalu saring menggunakan kertas saring.
- b) Dalam cawan penguap, uapkan filtrat tersebut.
- c) Tambahkan 1 tetes H_2SO_4 dan 2 tetes asam asetat anhidrat pada sisa penguapan
- d) filtrat.
- e) Ketika muncul warna hijau maupun biru, itu menandakan terdapat senyawa steroid. Ketika muncul warna ungu maupun merah, itu menandakan terdapat senyawa triterpenoid.
- f. Uji Aktivitas Antioksidan

Menurut Pindan et al. (2021) serta Fauzi dan Santoso (2021), prosedur berikut dapat dipakai pada proses verifikasi aktivitas antioksidan secara metode DPPH:

- 1) Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM
 - a) Timbang 1,971 mg kristal DPPH menggunakan neraca analitik.
 - b) Larutkan kristal DPPH dengan 50 mL metanol *pro analysis* menggunakan labu ukur 50 mL.
 - c) Campur larutan hingga homogen, lalu simpan dalam botol gelap dan bungkus dengan aluminium foil.
- 2) Pembuatan Larutan Sampel
 - a) Timbang 40 mg ekstrak metanol daun cengkeh menggunakan neraca analitik.
 - b) Ekstrak dilarutkan dengan 20 mL metanol *pro analysis* menggunakan labu ukur 20 mL.
 - c) Campur larutan hingga homogen, lalu simpan dalam botol gelap dan bungkus dengan aluminium foil.

- d) Secara berturut-turut, buat variasi konsentrasi kuersetin 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm.
- 3) Pembuatan Larutan Kuersetin
 - a) Timbang 2,5 mg kuersetin dengan neraca analitik.
 - b) Serbuk kuersetin dilakukan pelarutan dengan 50 mL metanol *pro analysis* menggunakan labu ukur 50 mL.
 - c) Campur larutan hingga homogen, kemudian dilakukan penyimpanan di botol gelap.
 - d) Secara berturut-turut, dilakukan pembuatan variasi konsentrasi kuersetin 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, serta 10 ppm.
- 4) Pembuatan Larutan Blanko
 - a) Disiapkan Tabung Reaksi
 - b) Ambil 5 mL larutan methanol *pro analysis* dengan pipet ukur kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5ml
- 5) Pembuatan Larutan Kontrol
 - a) Ambil 1 mL larutan DPPH menggunakan pipet ukur.
 - b) Tambahkan 4 mL metanol *pro analysis*, lalu dilakukan pengocokkan sampai homogen.
 - c) Dilakukan proses inkubasi larutan hingga 30 menit pada suhu 37°C di inkubator.
 - d) Ukur absorbansi larutan kontrol menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500-600 nm untuk mendapatkan panjang gelombang maksimum.
- 6) Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH
 - a) Ambil 4 mL larutan dari tiap-tiap variasi konsentrasi ekstrak daun Cengkeh serta kuersetin menggunakan pipet ukur 5ml di masukkan ke dalam labu ukur 5ml.
 - b) Tambahkan 1 mL larutan DPPH pada tiap-tiap labu ukur, lalu dilakukan pengocokkan sampai homogen.
 - c) Dilakukan proses inkubasi larutan hingga 30 menit pada suhu 37°C di inkubator.
 - d) Setelah inkubasi, amati perubahan warna yang terjadi.

- e) Ukur nilai absorbansi larutan dengan spektrofotometer UV-Vis di panjang gelombang maksimum yang diperoleh.
- f) Pembacaan dilakukan sebanyak 3 kali untuk setiap sampel.
- g) Terakhir, hitung nilai IC₅₀ (konsentrasi yang diperlukan sebagai penghambat 50% radikal DPPH).

E. Analisis Data dan Penentuan Persen Inhibasi

1. Cari absorbansi larutan blanko, larutan pembanding serta larutan sampel pada panjang gelombang maksimumnya. Untuk masing-masing larutan pembanding dan larutan sampel, pembacaan diulang sebanyak 3x untuk dicari rata-ratanya.
2. Setelah didapatkan absorbansi larutan blanko, larutan sampel dan larutan pembanding, selanjutnya hitung % inhibisi dengan rumus:

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

Keterangan:

- Absorbansi control adalah absorbansi larutan DPPH pada panjang gelombang maksimum (517 nm).
- Sampel absorbansi adalah absorbansi dari larutan uji atau larutan pembanding pada panjang gelombang maksimum (517 nm).

F. Penentuan Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ dapat dihitung dengan persamaan linier yang menghubungkan persentase penghambatan pada berbagai konsentrasi larutan uji serta larutan acuan (quercetin). Konsentrasi larutan uji yang mampu menghasilkan penghambatan radikal bebas 50% dikenal sebagai nilai IC₅₀. Rumus berikut dapat digunakan untuk menghitung nilai ini, yang didasarkan pada persamaan regresi linier korelasi antara I dan K:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

- Y = 50
- X = Konsentrasi larutan Uji (K)

Tabel 3.1 Kategori Kekuatan Aktivitas Antioksidan.

No	Kategori	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)
1	Sangat kuat	<50
2	Kuat	50 – 100
3	Sedang	101 – 250
4	Lemah	250 – 500
5	Tidak aktif	> 50

Sumber: (Nasution Batubara, Surjanto, 2015:6)

Untuk memudahkan peneliti dalam membuat persamaan garis linear, peneliti akan menggunakan microsoft excel dalam pengolahan data tersebut, sehingga dapat terlihat kurva perbandingan nilai IC_{50} masing-masing larutan sampel dan kategori aktivitas antioksidannya.