

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Penelitian ini terdiri dari tahap determinasi tumbuhan, pembuatan simplisia, pembuatan ekstrak dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi, uji kadar air, skrining fitokimia, dan analisis aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan ABTS dengan instrumen spektrofotometri UV-Vis.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari – Mei 2024. Lokasi pengambilan sampel daun Mangrove *Rhizophora stylosa* Griff. dilakukan di kawasan Ekowisata Mangrove PIK, Kapuk Muara, Kecamatan Penjaringan, Kota Jakarta Utara. Proses ekstraksi dan uji fitokimia dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Pelita Harapan. Proses analisis aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Pelita Harapan.

#### **3.3 Sampel Penelitian**

Sampel dalam penelitian ini adalah daun Mangrove jenis *Rhizophora stylosa* Griff. Sebanyak 1,5 kg sampel digunakan dalam pembuatan simplisia, lalu sebanyak 250 gram serbuk simplisia digunakan dalam pembuatan ekstrak, yang

kemudian ekstrak kering digunakan dalam skrining fitokimia, dan uji aktivitas antioksidan. Teknik pengambilan sampel *purposive sampling* dengan kriteria yaitu daun yang bewarna hijau cerah, besar, tidak ada cacat dan tidak layu.

### **3.4 Instrumen Penelitian**

#### **3.4.1 Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik, grinder, toples maserasi, *rotary evaporator*, oven, *moisture analyzer*, *beaker glass*, corong, cawan penguap, gelas ukur, tabung reaksi, labu ukur, mikropipet, vortex, kuvet, tip mikropipet (Gilson Pipetman), *tube eppendorf*, spektrofotometri UV-Vis, gunting, spatula, sendok tanduk, batang pengaduk, dan pipet tetes.

#### **3.4.2 Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia daun Mangrove (*Rhizophora stylosa* Griff.), etanol 96% (Merck), akuades, perkamen, kertas saring, aluminium foil, *plastic wrap*, amil alkohol, serbuk Mg, kloroform, ammonia 25%,  $\text{FeCl}_3$  1%,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N, HCl pekat, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Lieberman-Burchard, DPPH (Sigma-Aldrich), vitamin C (Merck), ABTS (Sigma-Aldrich), kalium persulfat (Merck), dan etanol *pro analysis* (Merck).

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Determinasi Tumbuhan**

Tanaman Mangrove yang akan digunakan untuk penelitian dideterminasi dengan melakukan pengiriman sampel ke BRIN (Badan Riset dan Inovasi Nasional) Cibinong, Bogor. Determinasi dilakukan untuk menjamin bahwa tanaman yang digunakan adalah spesies yang tepat.

#### **3.5.2 Pembuatan Simplisia**

Sebanyak 1,5 kg daun segar Mangrove (*Rhizophora stylosa* Griff.) dipetik dan dikumpulkan. Lalu dilakukan sortasi basah untuk memisahkan daun yang tidak memenuhi kriteria sampel dan memisahkan daun dari pengotor. Daun yang sudah disortasi kemudian dicuci menggunakan air mengalir. Daun yang telah dicuci ditiriskan, lalu dirajang menggunakan pisau, kemudian dikeringkan menggunakan oven bersuhu 40-50°C. Daun yang telah kering kemudian disortasi kering untuk memisahkan simplisia dari pengotor, lalu dihaluskan dengan grinder, ditimbang dan disimpan dalam wadah toples (Riyani, 2016).

#### **3.5.3 Pembuatan Ekstrak**

Sebanyak 250 g serbuk simplisia dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan pengulangan maserasi sebanyak 5 kali. Ekstrak ditampung dalam *beaker glass*, lalu disaring dengan kertas saring, filtrat kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Kemudian ekstrak cair diletakkan pada cawan penguap, lalu disimpan dalam oven untuk mengentalkan ekstrak. Sisa ekstrak

yang belum dikentalkan disimpan dalam toples atau cawan penguap yang kemudian diberi aluminium foil. Setelah diperoleh hasil ekstrak maka dilakukan perhitungan *Rendemen* ekstrak (%b/b) (Aristyanti *et al.*, 2017). Presentase hasil dihitung dengan rumus:

$$\%Rendemen\ ekstrak = \frac{bobot\ ekstrak}{bobot\ simplisia} \times 100\%$$

#### 3.5.4 Skrining Fitokimia

Uji golongan senyawa kimia dilakukan menggunakan simplisia dan ekstrak kering dengan prosedur yang telah dilakukan oleh Harborne (Harborne *et al.*, 1987) dan Depkes (Depkes, 1995):

##### a. Alkaloid

Sebanyak 100 mg simplisia atau ekstrak kering ditambahkan dengan 4 mL kloroform dan 4 mL ammonia, lalu disaring. Filtrat kemudian ditambahkan dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat sebanyak 3-5 tetes dan dikocok hingga membentuk dua lapisan. Bagian atas kemudian diambil dan diletakkan pada dua tabung reaksi. Pada masing tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi Dragendorff dan pereaksi Mayer. Ekstrak positif alkaloid ditandai dengan berubah warna sampel menjadi kuning hingga merah ketika ditambah pereaksi Dragendorff dan berubah warna sampel menjadi putih ketika ditambah pereaksi Mayer.

##### b. Flavonoid

Sebanyak 100 mg simplisia atau ekstrak kering dilarutkan dalam 20 mL air yang dipanaskan lalu sebanyak 3 mL larutan ekstrak diletakkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan 100 mg serbuk Mg, 1 mL HCl pekat, dan 1 mL

amil alkohol kemudian dikocok kuat. Positif flavonoid ditandai dengan terjadinya perubahan warna sampel menjadi kuning, merah, hingga coklat.

**c. Saponin**

Sebanyak 100 mg simplisia atau ekstrak kering dicampur dengan 30 mL air dan dikocok selama 1 menit. Kemudian ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Busa yang tetap stabil selama  $\pm$  15 menit menunjukkan ekstrak positif mengandung saponin.

**d. Tanin**

Sebanyak 100 mg simplisia atau ekstrak kering dicampur dengan 50 mL air yang dipanaskan. Lalu 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 5 tetes FeCl<sub>3</sub> 1%. Perubahan warna ekstrak menjadi hijau kehitaman menunjukkan ekstrak mengandung senyawa tanin.

**e. Fenol**

Sebanyak 100 mg simplisia atau ekstrak kering ditambahkan dengan amonia 25% sebanyak 5 mL, lalu ditambahkan kloroform sebanyak 20 mL sambil digerus. Kemudian disaring dan masukkan filtrat ke dalam tabung reaksi. Tetesi larutan dengan menggunakan FeCl<sub>3</sub>. Hasil positif senyawa fenol ditunjukkan dengan adanya pembentukan endapan hijau kehitaman.

**f. Triterpenoid dan Steroid**

Sebanyak 100 mg simplisia atau ekstrak kering ditambahkan dengan 10 tetes asam asetat glasial, dan kemudian ditambahkan 2 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Setelah itu, campuran dicampur dan dibiarkan selama beberapa menit. Positif triterpenoid ditandai dengan terjadinya perubahan warna campuran menjadi merah atau ungu

dan positif steroid ditandai dengan terjadi perubahan warna menjadi biru atau hijau.

### **3.5.5 Uji Aktivitas Antioksidan**

#### **1. Pembuatan Larutan DPPH 100 ppm**

Larutan stok DPPH dibuat dalam konsentrasi 100 ppm, dimana sebanyak 10 mg DPPH dilarutkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas. Lalu tempatkan larutan DPPH di botol gelap. Kemudian buat konsentrasi larutan DPPH 50 ppm yang digunakan untuk penentuan panjang gelombang maksimum dengan absorbansi mendekati 1. Dimana sebanyak 25 mL larutan DPPH 100 ppm diambil dan dimasukkan ke dalam botol gelap, lalu ditambahkan etanol p.a sebanyak 25 mL.

#### **2. Pembuatan Larutan Kation ABTS**

Sebanyak 70 mg serbuk ABTS dan 35 mg serbuk kalium persulfat ditimbang, lalu masing-masing serbuk dilarutkan dalam 50 ml aquadest, dan diinkubasi selama 16 jam. Kemudian campur kedua larutan tersebut dalam ruang gelap. Sebanyak 25 mL larutan kation ABTS diambil dan dimasukkan ke dalam botol gelap kemudian ditambahkan etanol p.a sebanyak 50 mL. Lalu dikocok dan diukur sebagai larutan blanko.

### **3. Pembuatan Larutan Ekstrak**

Larutan stok sampel dibuat dalam konsentrasi 250 ppm, dimana sebanyak 25 mg ekstrak kering dilarutkan dalam 100 mL etanol p.a. Kemudian dibuat seri konsentrasi yaitu masing-masing larutan ekstrak sebanyak 0,8 mL, 1,6 mL, 2,4 mL, 3,2 mL, dan 4 mL dimasukkan dalam tube 4 mL dengan menambahkan etanol p.a, sehingga diperoleh konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm.

### **4. Pembuatan Larutan Vitamin C sebagai Pembanding**

Larutan stok vitamin C dibuat dalam konsentrasi 100 ppm, dimana sebanyak 10 mg vitamin C dilarutkan dalam 100 mL etanol p.a. Kemudian dibuat seri konsentrasi yaitu masing-masing larutan vitamin C sebanyak 0,16 mL, 0,32 mL, 0,48 mL, 0,64 mL, dan 0,8 mL dimasukkan dalam tube 4 mL dengan menambahkan etanol p.a, sehingga diperoleh konsentrasi 4, 8, 12, 16, dan 20 ppm.

### **5. Optimasi Metode DPPH**

#### **a) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH**

Sebanyak etanol p.a sebanyak 0,25 mL dimasukkan ke dalam tube 1 mL, lalu ditambahkan 0,75 mL larutan DPPH 50 ppm. Larutan tersebut divortex, dan diukur serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm. Kemudian ditentukan panjang gelombang maksimum DPPH dengan nilai absorbansi mendekati 1.

**b) Penentuan *Operating Time***

Sebanyak etanol p.a sebanyak 0,25 mL dimasukkan ke dalam tube 1 mL, lalu ditambahkan 0,75 mL larutan DPPH. Larutan tersebut divortex, dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yang didapat setiap 5 menit selama 60 menit.

**6. Optimasi Metode ABTS**

**a) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum ABTS**

Sebanyak etanol p.a sebanyak 0,25 mL dimasukkan ke dalam tube 1 mL, lalu ditambahkan 0,75 mL larutan kation ABTS. Larutan tersebut divortex, dan diukur serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm. Kemudian ditentukan panjang gelombang maksimum DPPH dengan nilai absorbansi mendekati 1.

**b) Penentuan *Operating Time***

Sebanyak etanol p.a sebanyak 0,25 mL dimasukkan ke dalam tube 1 mL, lalu ditambahkan 0,75 mL larutan kation ABTS. Larutan tersebut divortex, dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yang didapat setiap 5 menit selama 60 menit.

**7. Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH**

**a) Pengukuran Aktivitas Pengikatan DPPH dengan Sampel**

Larutan dibuat dalam tube 1 mL, dimana sebanyak 0,75 mL larutan DPPH dan sebanyak 0,25 mL masing-masing konsentrasi sampel 50 ppm, 100 ppm, 150



ppm, 200 ppm, dan 250 ppm larutan sampel dimasukkan ke dalam tube, lalu divortex sampai homogen dan diinkubasi selama 45 menit. Serapan dari larutan diukur pada panjang gelombang 518 nm.

Besarnya persentase peredaman radikal bebas dari sampel terhadap DPPH dapat dihitung menggunakan rumus berikut (Abdullah & Apriandi, 2011).

$$\% \text{ Pengikatan radikal bebas} = \frac{(\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel}) \times 100\%}{(\text{Abs blanko})}$$

#### **b) Pengukuran Aktivitas Pengikatan DPPH dengan Vitamin C**

Larutan dibuat dalam tube 1 mL, dimana sebanyak 0,75 mL larutan DPPH dan sebanyak 0,25 mL masing-masing konsentrasi vitamin C 4 ppm, 8 ppm, 12 ppm, 16 ppm, dan 20 ppm larutan sampel dimasukkan ke dalam tube, lalu divortex sampai homogen dan diinkubasi selama 45 menit. Serapan dari larutan diukur pada panjang gelombang 518 nm.

### **8. Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode ABTS**

#### **a) Pengukuran Aktivitas Pengikatan Kation ABTS dengan Sampel**

Larutan dibuat dalam tube 1 mL, dimana sebanyak 0,75 mL larutan kation ABTS dan sebanyak 0,25 mL masing-masing konsentrasi sampel 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm larutan sampel dimasukkan ke dalam tube, lalu divortex sampai homogen dan diinkubasi selama 45 menit. Serapan dari larutan diukur pada panjang gelombang 736 nm.

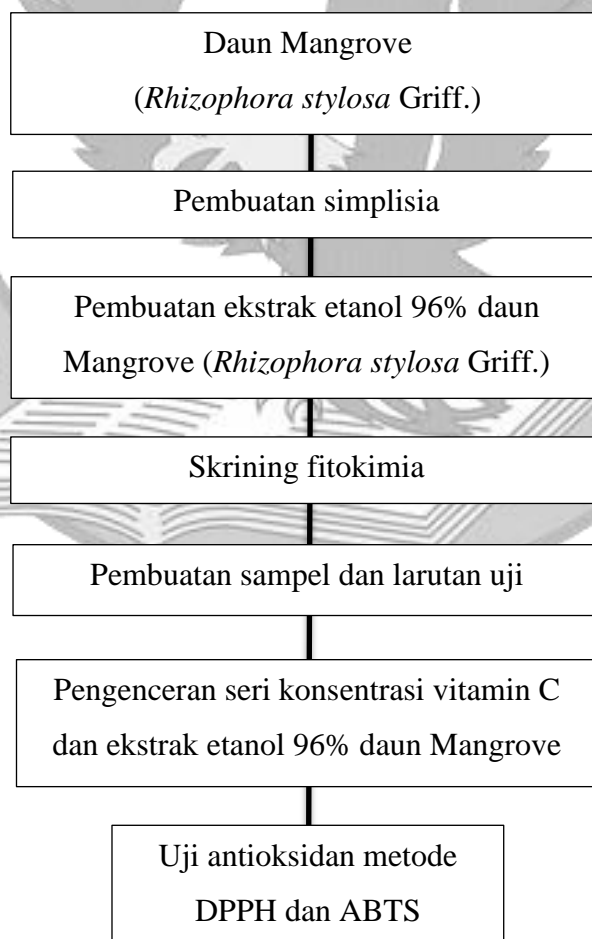
Besarnya persentase peredaman radikal bebas dari sampel terhadap DPPH dapat dihitung menggunakan rumus (Abdullah & Apriandi, 2011).

$$\% \text{ Pengikatan radikal bebas} = \frac{(\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel}) \times 100\%}{(\text{Abs blanko})}$$

**b) Pengukuran Aktivitas Pengikatan Kation ABTS dengan Vitamin C**

Larutan dibuat dalam tube 1 mL, dimana sebanyak 0,75 mL larutan kation ABTS dan sebanyak 0,25 mL masing-masing konsentrasi vitamin C 4 ppm, 8 ppm, 12 ppm, 16 ppm, dan 20 ppm larutan sampel dimasukkan ke dalam tube, lalu divortex sampai homogen dan diinkubasi selama 45 menit. Serapan dari larutan diukur pada panjang gelombang 736 nm.

**3.6 Alur Penelitian**



### 3.7 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan mengukur serapan sampel dan menghitung % inhibisi. Data dianalisis dengan membuat kurva kalibrasi, dimana x sebagai konsentrasi dengan % inhibisi dan y sebagai serapan larutan, kemudian dimasukkan ke dalam program Microsoft Excel 2019 sehingga mendapatkan persamaan regresi linier ( $y = bx \pm a$ ) dan dihitung nilai  $IC_{50}$ . Selanjutnya dilakukan analisis statistik dengan uji komparatif antar perlakuan menggunakan *Independent T-test*.

