

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental murni, yang dimana metode yang digunakan yaitu metode kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui kandungan flavonoid dari daun sambiloto dan metode kuantitatif yang bertujuan untuk mengetahui potensi antioksidan ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) dari dua daerah berbeda.

B. Waktu Dan Tempat Penelitian

1. Waktu penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan desember 2022-februari 2023

2. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitikomia, Laboratorium Instrumen program studi S1 Farmasi Universitas Ngudi Waluyo dan Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Fakultas MIPA Universitas Diponegoro.

C. Subjek Penelitian

Populasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun sambiloto yang berasal dari dua daerah berbeda yaitu daerah Ungaran, Jawa Tengah dan daerah Kefamenau, Nusa Tenggara Timur. Sampel yang dipakai pada penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun sambiloto.

D. Defenisi Operasional

Defenisi operasional pada penelitian ini meliputi :

1. Daun sambiloto yang menjadi sampel Daun sambiloto yang menjadi sampel diperoleh dari daerah sekitar Ungaran, Jawa Tengah dan daerah Timor Tengah Utara, Nusa Tenggara Timur.
2. Pembuatan ekstrak daun sambiloto dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi sokletasi.
3. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan penyari etanol 96%.
4. Skrining fitokimia dilakukan dengan menambahkan 1 ml HCL dan 0,5 mg serbuk magnesium untuk uji flavonoid, pegojokan dengan air hangat dan ditetesi dengan HCL untuk melihat kestabilan busa untuk uji saponin, etil asetat ditambahkan FeCl_3 1% untuk uji tanin.
5. Metode DPPH digunakan sebagai metode untuk menguji aktivitas antiosidan ekstrak daun sambiloto.
6. Spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk mengukur serapan dengan menggunakan vitamin C sebagai larutan pembanding.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil ekstraksi simplisia daun sambiloto dari dua daerah berbeda.

2. Variabel terikat

Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu aktivitas antioksidan ekstrak daun sambiloto dalam menangkal radikal bebas.

F. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat sokletasi dan maserasi, spektrofotometer UV-Vis, rotary evaporator, batang pengaduk, kain hitam, ayakan mesh no.40, blender, timbangan, labu ukur, pipet, kertas saring, pipet volume, rak dan tabung reaksi, cawan porselen dan gelas ukur.

2. Bahan

Bahan yang dipakai yaitu daun sambiloto dari daerah sekitar Semarang Jawa Tengah dan daerah sekitar Timor Tengah Utara, Nusa Tenggara Timur. Bahan kimia yang digunakan yaitu etanol 96%, vitamin C, 1,1 Diphenyl-2-Picrylhidrazil (DPPH), aquadest, H_2SO_4 pekat, Kalium dikromat, serbuk magnesium, HCL, etil asetat, $FeCl_3$ 1%.

G. Prosedur Kerja

1. Penyiapan bahan

Sampel daun sambiloto diambil daunnya lalu dilakukan sortasi basah untuk dipisahkan dari benda- benda asing atau kotoran, kemudian dicuci dengan menggunakan air yang mengalir sampai bersih. Lalu dikeringkan dengan cara diangin- anginkan pada suhu kamar sampai benar- benar kering. Setelah kering,

daun sambiloto dihaluskan dengan menggunakan blender, lalu kemudian di ayak dengan menggunakan ayakan mesh no.40 dengan tujuan untuk memperoleh hasil partikel serbuk yang lebih kecil atau halus untuk mempermudah saat dikakukannya proses ekstraksi dikarenakan permukaan dari serbuk simplisia yang bersentuhan dengan cairan pelarut semakin luas (Habiba *et al.*,2022).

2. Determinasi tanaman

Sampel uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun sambiloto (*Andrographis paniculata*). Sebelum dilakukan ekstraksi, tumbuhan terlebih dahulu di determinasi untuk mengidentifikasi ketepatan spesies. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Fakultas MIPA Universitas Diponegoro.

3. Pembuatan ekstrak daun sambiloto

a. Ekstraksi dengan menggunakan metode sokletasi

Rangkai dan pasang alat soklet lalu timbang serbuk simplisia daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) dari masing-masing daerah sebanyak 150 gram dibungkus dengan menggunakan kertas saring, lalu dimasukkan kedalam alat soklet. Masukkan pelarut etanol 96% sebanyak 800 mL, lakukan ekstraksi dengan menggunakan sokletasi hingga daun sambiloto tidak berwarna lagi.

Ekstrak yang didapat kemudian dilakukan penguapan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan tekanan 50 mbar tujuannya untuk mendapatkan ekstrak kental dari sampel.

b. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan pada sampel yang sudah kental dengan tujuan untuk membebaskan ekstrak dari etanol agar mendapatkan hasil ekstrak yang murni. Uji bebas etanol dilakukan dengan menambahkan 2 tetes H_2SO_4 pekat dan 1 ml larutan kalium dikromat (Astutik *et al.*, 2021).

c. Penentuan rendemen ekstrak

Rendemen ekstrak adalah perbandingan yang diperoleh dengan simplisia awal. Rendemen ekstrak sendiri merupakan parameter yang digunakan untuk menilai mutu suatu ekstrak.

4. Skrining fitokimia

Uji kandungan metabolit sekunder atau skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya kandungan metabolit sekunder pada tanaman. Uji kandungan metabolit sekunder dilakukan untuk mengetahui adanya kandungan metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak daun sambiloto. Uji flavonoid dilakukan dengan mereaksikan sampel dengan menggunakan 1 ml HCL dan 0,5 mg serbuk mg. flavonoid dikatakan positif jika hasil yang diperoleh menunjukkan warna merah atau jingga (Saleem *et al.*, 2017). Uji saponin dilakukan dengan penggojokkan dengan menggunakan air hangat yang selanjutnya ditetesi dengan HCL untuk melihat kestabilan busa. Uji tanin dilakukan dengan cara sampel dilarutkan terlebih dahulu dengan menggunakan etil asetat kemudian ditambahkan $FeCl_3$ 1% hasil positif akan menunjukkan warna hitam kebiruan (Marlinda *et al.*, 2012).

5. Pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang DPPH dilakukan dengan menimbang 4 mg serbuk DPPH lalu dilarutkan dengan menggunakan etanol pada labu ukur 100 mL sehingga didapatkan konsentrasi larutan induk DPPH 40 ppm.

b. Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak daun sambiloto dari dua daerah berbeda

Ekstrak kental dari daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) dari masing-masing daerah yang diperoleh dari perlakuan dua metode ekstraksi berbeda ditimbang sebanyak 25 gram lalu dilarutkan dalam etanol 96% dan dicukupkan volumenya hingga 25 mL (100 ppm). Kemudian diberi seri konsentrasi ekstrak kental daun sambiloto 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengambil sebanyak 0,5 mL larutan sampel daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) dari berbagai konsentrasi. Pada masing-masing larutan ditambahkan 3,5 mL DPPH 0,5 ml. larutan kemudian diinkubasi selama 12 menit (berdasarkan hasil operating time) dan dilakukan pada ruangan yang gelap lalu serapannya diukur pada panjang gelombang 515-520 nm.

c. Pembuatan larutan pembanding vitamin C

Sebanyak 25 mg vitamin C ditambahkan aquadest secukupnya, kemudian untuk volume akhir dicukupkan dengan menggunakan etanol

hingga 25 mL. kemudian dari larutan tersebut diberi seri konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm.

d. Pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Serapan diukur setelah didiamkan selama 20 menit pada panjang gelombang 517 nm. Hasil penetapan antioksidan yang didapatkan dibandingkan dengan vitamin C (Riskayanti *et al.*,2017).

H. Analisis Data

1. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak Berupa Pasta (gram)}}{\text{Berat Serbuk Sampilisia Kering (gram)}} \times 100\%$$

2. Peredaman radikal bebas

Besarnya presentase dari perendaman radikal bebas dari sampel terhadap DPPH dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ peningkatan radikal bebas} = \frac{\text{absorbansi blako} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

3. Nilai IC₅₀

Setelah didapat nilai perendaman radikal bebas dari masing- masing konsentrasi dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linear (x,y) dimana perhitungan ini dilakukan untuk mendapatkan nilai IC₅₀ dimana sumbu x sebagai konsentrasi sampel (ppn) dan % inhibisi sebagai sumbu y. nilai IC₅₀ berfungsi untuk menunjukkan konsentrasi yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. IC₅₀ etanol daun sambiloto dan vitamin C diperoleh dengan menggunakan rumus (Riskianto *et al.*,2021):

$$IC_{50} = \frac{(50-a)}{b}$$

4. Uji Statistika

Data pada penelitian ini dianalisis secara deskriptif. Analisis dilakukan secara statistik menggunakan metode analisis varian satu jalan Uji One Way ANOVA, SPSS versi 26 dengan taraf kepercayaan 95% (Lestari et al., 2020).

a. Uji Normalitas

Uji normalitas menggunakan uji normalitas One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test. Sebelum dilakukan uji statistik harus dilakukan uji normalitas terlebih dahulu untuk memastikan data terdistribusi normal ($P > 0,05$) (Hidayati, 2021). Uji normalitas ini bertujuan untuk menguji apakah dalam model regresi, variable pengganggu atau residual memiliki data yang terdistribusi normal atau tidak (Siregar, 2015). Pengambilan kesimpulan dari uji normalitas dapat dilihat berdasarkan:

- 1) Jika nilai signifikansi yang diperoleh $> 0,05$ maka data dinyatakan terdistribusi normal.
- 2) Jika nilai signifikansi $< 0,05$ maka data dinyatakan tidak terdistribusi normal.

b. Uji Post-Hoc LSD (Least Significant Different)

Uji LSD (Least Significant Different) merupakan suatu prosedur lanjutan yang bertujuan untuk mengetahui perlakuan mana saja yang berbeda secara signifikan apabila hipotesis nol ditolak (Montgomery, 2011).