

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental, untuk menentukan aktivitas antioksidan ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) berdasarkan nilai IC₅₀. Pelarut yang digunakan yaitu etanol 70%, dengan variasi maserasi dan sokletasi menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-2-pikrilhidrazil*).

B. Lokasi Penelitian

1. Lokasi

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Uji fitokimia dan pembuatan ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) di laboratorium bahan alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Uji aktivitas antioksidan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu : Mei - Juli 2023

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang berasal dari Desa Kalirejo, Kabupaten Semarang.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang digunakan sebanyak 300 gram. Dengan kriteria yaitu daun salam berwarna hijau tua, daun lebar dan tidak cacat,

D. Definisi Operasional

1. Ekstrak daun salam adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia daun salam
2. Maserasi adalah proses ekstraksi perendaman serbuk tanaman dengan menggunakan pelarut yang sesuai ke dalam wadah yang tertutup rapat dan pada suhu kamar selama 5 hari.
3. Sokletasi adalah proses ekstraksi cairan penyarian dengan cara bahan yang akan diekstraksi dimasukkan ke dalam sebuah alat ekstraksi (klongsong) yang bekerja secara kontinyu.
4. Metode DPPH adalah adanya atom hidrogen dari senyawa antioksidan yang berikatan dengan elektron bebas pada senyawa radikal sehingga menyebabkan perubahan dari radikal bebas (*diphenylpicrylhydrazyl*) menjadi senyawa non-radikal (*diphenylpicrylhydrazine*).

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dengan metode ekstraksi dan konsentrasi ekstrak 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm dan 30 ppm.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Nilai IC_{50} dari ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang menyatakan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH.
- b. Kategori nilai % Inhibisi dari ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*).

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah cahaya, reagen, waktu, suhu, dan panjang gelombang absorbansi.

F. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayakan 40, blender (PHILIPS), batang pengaduk, neraca analitik (OHAUS), tabung reaksi (IWAKI), penjepit kayu, gelas ukur, pipet tetes, corong kaca (IWAKI), beaker glass (HERMA), labu ukur (IWAKI), pipet ukur 10 ml (PYREX), pipet ukur 1 ml (PYREX), pipet palleus ball, rotary evaporator (RE 2000E), cawan porselen, waterbatch, spektrofotometri UV-Vis (SHIMADZU), oven

(MEMMERT), seperangkat alat sokletasi, kertas saring, serbet, tissue, kain flanel, spatula, mikropipet dan Hot Plate (MASPION).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam (*Syzygium polyanthum*), etanol 70%, etanol p.a (PT.Smart Lab Indonesia), kuersetin, aquadest, pereaksi dragendrof, pereaksi mayer, serbuk Mg, HCl pekat, aluminium foil, pereaksi FeCl₃, H₂SO₄, K₂Cr₂O₇, NaCl, dan serbuk DPPH (Tokyo Chemical industry).

G. Pengolahan Data

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

2. Pembuatan Simplisia

Proses pembuatan simplisia diawali dengan pengumpulan bahan baku daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang diambil dari Desa Kalirejo, Kabupaten Semarang, setelah itu dilakukan sortasi basah, kemudian dilakukan pencucian bahan dengan air yang mengalir. Bahan-bahan yang sudah bersih ditiriskan airnya, tahap selanjutnya perajangan dengan cara potong kecil-kecil, selanjutnya pengeringan dilakukan dengan ditutupi kain hitam menggunakan bantuan sinar matahari langsung. Simplisia yang sudah dikeringkan dilakukan sortasi kering dengan cara memilih daun salam yang sudah kering dari yang rusak atau terkena kotoran. Selanjutnya simplisia

dihaluskan dengan blender kemudian diayak menggunakan ayakan dengan derajat kehalusan 40 mesh (Husni *et al.*, 2018).

3. Uji Standarisasi Non Spesifik Pada Simplisia

a. Uji Kadar Air Simplisia

Setelah simplisia kering, dilakukan uji kadar air dengan cara menimbang cawan porselin kemudian dilanjutkan dengan menimbang masing-masing 2 gram serbuk simplisia, kemudian masukkan kedalam oven selama 3 jam dengan suhu 105°C. keluarkan cawan yang berisi simplisia lalu dinginkan dan timbang kembali (Himawan *et al.*, 2018).

Perhitungan kadar air menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

Keterangan: a = bobot sampel sebelum pemanasan (gram)

b = bobot sampel sesudah pemanasan (gram)

b. Uji Kadar Abu

Penetapan kadar abu dilakukan dengan cara ditimbang 2 gram simplisia kemudian dimasukan ke dalam cawan krusible yang sudah diketahui bobotnya, selanjutnya diabukan dalam tanur listrik pada suhu maksimum 600°C selama 3 jam sampai pengabuan sempurna (sekali-kali pintu tanur di buka sedikit, agar oksigen bisa masuk) dan didinginkan kemudian di timbang sampai bobot tetap (Helilusiatiningsih, 2020)

Kadar abu dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Abu} = \frac{\text{Berat Abu (g)}}{\text{Berat Sampel}} \times 100 \%$$

Keterangan:

Berat abu = berat cawan dan sampel setelah pengeringan – berat cawan kosong

Berat sampel = berat cawan dan sampel sebelum pengeringan – berat cawan kosong.

4. Pembuatan Ekstrak

- a. Pembuatan ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) dengan metode ekstraksi maserasi.

Dengan menimbang 300 gram serbuk daun salam kemudian di ekstraksi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 2000 ml atau 2 liter selama 3 hari terlindungi dari cahaya dan sambil sering diaduk untuk meratakan konsentrasi larutan di luar butir serbuk simplisia, sehingga terjadi keseimbangan antara konsentrasi di dalam dan di luar sel. Setelah 3 hari dilakukan penyarian untuk mendapatkan residu filtrat menggunakan kertas flanel dan residu diremaserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1000 ml selama 2 hari. Filtrat dikumpulkan dan dipekatkan dengan rotary evaporator untuk memisahkan ekstrak dari cairan penyari dengan suhu 50°C kemudian dikentalkan menggunakan waterbath dengan suhu 60°C dan dihitung rendemen (Sektiaji, 2019).

- b. Pembuatan ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) dengan metode ekstraksi sokletasi

Dengan menimbang 300 gram serbuk daun salam terbagi menjadi tiap klongsong yaitu 25 gram, kemudian dibungkus dengan kertas saring dan ujungnya diikat lalu dimasukkan kedalam tabung soklet. Sebanyak 3000 ml atau 3 liter etanol 70% yang terbagi menjadi 250 ml tiap soklet dimasukkan melalui bagian atas alat soklet. Diamkan selama 8 jam dengan suhu 40°C-60°C selama 6 hari (Wijaya *et al.*, 2019). Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 50 °C sampai terbentuk semi kental kemudian dikentalkan dengan waterbath dengan suhu 60°C menggunakan cawan porselin sampai terbentuk ekstrak kental kemudian hitung rendemen.

Perhitungan Rendemen :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak (g)}}{\text{Berat Sampel (g)}} \times 100 \%$$

5. Uji Kadar Air Pada Ekstrak

Uji kadar air pada ekstrak daun salam ditimbang masing-masing 2 g. Ekstrak dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 3 jam, keluarkan cawan yang berisi ekstrak lalu dinginkan dan timbang kembali. Syarat kadar air pada ekstrak yaitu $\leq 10\%$. (Utami *et al.*, 2017).

Menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

Keterangan: a = bobot sampel sebelum pemanasan (gram)

b = bobot sampel sesudah pemanasan (gram)

6. Uji Bebas etanol

Pengujian bebas etanol dilakukan dengan cara memasukkan masing-masing ekstrak kental ke dalam tabung reaksi yang berbeda kemudian ekstrak ditambahkan H_2SO_4 pekat dan 1 ml larutan kalium dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) yang selanjutnya diamati perubahan warna yang terjadi, jika pada larutan ekstrak mengandung etanol maka akan terjadi perubahan warna yang dari jingga menjadi hijau kebiruan (Esati *et al.*, 2021).

7. Uji Skrining Fitokimia

a. Flavonoid

Sebanyak 0,1 g ekstrak daun salam ditambahkan dengan 5 mL etanol *p.a* kemudian ditambahkan lagi dengan 0,1 gram logam Mg. Jika terbentuk warna kuning jingga menunjukkan reaksi positif adanya flavonoid (Bahriul *et al.*, 2014).

b. Alkaloid

Sebanyak 0,1 g ekstrak daun salam ditambahkan dengan 5 mL etanol *p.a* kemudian ditambahkan dengan Reagen Mayer setetes demi setetes. Terbentuknya endapan yang berwarna merah sebagai indikator reaksi positif adanya alkaloid (Bahriul *et al.*, 2014).

c. Tanin

Sebanyak 0,1 g ekstrak daun salam ditambahkan dengan 5 mL etanol *p.a* kemudian ditetesi dengan FeCl_3 1%. Terbentuk warna biru tua menunjukkan reaksi positif adanya tanin (Bahriul *et al.*, 2014).

d. Saponin

Sebanyak 0,1 g ekstrak daun salam ditambahkan dengan 5 mL aquades panas lalu didinginkan. Setelah itu campuran dikocok sampai muncul buih dan didiamkan selama 2 menit. Selanjutnya campuran ditambahkan dengan 2 tetes HCl 2 N dan dikocok lagi sampai terbentuk buih yang mantap selama 10 menit. Terbentuknya buih tersebut sebagai indikator reaksi positif adanya saponin (Bahriul *et al.*, 2014).

e. Fenol

Sebanyak 0,1 gram ekstrak daun salam ditambahkan aquadest panas kemudian didinginkan pada suhu ruang. Setelah dingin ditambahkan 5 tetes larutan NaCl 10% dan 3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan adanya perubahan warna menjadi warna hitam kebiruan/ hitam kehijauan (Nintiasari, 2022).

8. Pembuatan stok DPPH (0,4mM)

Molaritas DPPH yang dibutuhkan = 0,4 mM = 0,0004M (4×10^{-4} M)

BM (Berat Molekul) DPPH = 394,32 g/mol

Volume larutan = 100 ml (0,1 liter)

Penimbangan DPPH = BM DPPH x Vol larutan x Molaritas

DPPH = 394,32 g/mol x 0,1 L x 0,0004

= 0,0157728 g → 15,8 mg

9. Pembuatan Larutan DPPH (0,4mM)

Larutan DPPH 0,4 mM dibuat dengan melarutkan 15,8 mg serbuk DPPH ke 100 mL etanol *p.a* dalam labu sampai tepat 100 ml. Larutan DPPH yang diperoleh selanjutnya diukur operating time dan panjang gelombang maksimumnya (Kurniawati, 2021).

10. Pengujian DPPH

1. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH Larutan DPPH 0,4 mM

Larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 4 mL dalam etanol *p.a* ditambahkan sampai tanda batas etanol *p.a* pada abu ukur 5 ml kemudian didiamkan selama 30 menit ditempat gelap. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara mengukur serapan DPPH dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm untuk memperoleh absorbansi $\pm 0,2-0,8$ (Pamungkas *et al.*, 2017).

2. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara 4 ml larutan DPPH 0,4 mM dan ditambah dengan larutan kuersetin 3 ppm sampai tanda batas pada labu ukur 5 mL. Selanjutnya larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan, yang dimulai dari menit ke-0 hingga menit ke-30 dengan selang waktu 1 menit sampai didapatkan absorbansi yang sudah stabil (Alifni *et al.*, 2017).

3. Penentuan absorbansi blanko

Larutan DPPH sebanyak 4 ml ditambahkan etanol *p.a* ke dalam labu ukur 5 ml. kemudian serapan larutan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Susiloningrum, 2021).

4. Pengujian kuersetin sebagai pembanding

Serbuk kuersetin sebanyak 10 mg, dilarutkan dalam etanol *p.a* lalu dimasukkan dalam labu ukur 100 ml. Volume dicukupkan dengan etanol sampai batas tanda. Sehingga didapat konsentrasi larutan kuersetin 100 ppm. Lalu dibuat seri larutan menjadi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm. Sebanyak 4 mL larutan DPPH, ditambahkan 1 ml larutan standar kuersetin kemudian ditambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas pada labu ukur 5 ml, lalu diinkubasi di tempat yang gelap selama operating time yang didapatkan, setelah itu pembacaan absorbansi seri kadar menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan gelombang maksimum (Susiloningrum dan Sari, 2021).

5. Pembuatan larutan induk ekstrak daun salam

Ekstrak daun salam ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan etanol *p.a* kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml. Volume dicukupkan dengan etanol sampai tanda batas dan kocok sampai homogen.

11. Uji Antioksidan

Ekstrak daun salam ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan etanol *p.a* kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Larutan ekstrak daun salam diencerkan dengan berbagai seri kadar 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm dan 30 ppm. Masing-masing konsentrasi pada setiap konsentrasi diambil 1 mL dimasukkan kedalam labu ukur, lalu ditambahkan 4 mL DPPH 0,4 mM dan ditambahkan etanol *p.a* pada labu ukur 5 ml, kemudian diinkubasi selama operating time dan gelombang maksimum yang didapatkan. Kemudian masing-masing kadar seri konsentrasi diukur nilai absorbansinya pada gelombang maksimum (Sektiaji, 2019).

H. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa nilai absorbansi dari ekstrak daun alam serta pembanding kuersetin, kemudian dihitung persentase aktivitas antioksidannya dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorban Kontrol} - \text{Absorban Sampel}}{\text{Absorban Kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan :

Absorbansi kontrol : absorbansi DPPH

Absorbansi sampel : absorbansi ekstrak daun salam, dan pembanding kuersetin.

Setelah mendapatkan persentase dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linier (x,y) untuk mendapatkan nilai IC₅₀ dimana x sebagai konsentrasi (ppm) dan y sebagai

persentasi inhibisi (%) IC_{50} sampel dan pembanding diperoleh dengan rumus:

$$Y = a + bx$$

Pengujian antioksidan dilakukan replikasi 3 kali, setelah dilakukan pengujian antioksidan data hasil yang diperoleh selanjutnya data diolah menggunakan excel untuk menghitung nilai IC_{50} dan dianalisis secara statistik parametrik untuk melihat perbedaan aktivitas antioksidan daun salam antara ekstraksi metode maserasi dan metode sokletasi yang dianalisis menggunakan Oneway Anova menggunakan metode SPSS. Namun, langkah pertama yang dilakukan adalah uji normalitas terlebih dahulu untuk mengetahui data yang diperoleh telah berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro Wilk* karena sampel kurang dari 50, suatu data yang dikatakan terdistribusi normal dengan nilai signifikan $>0,05$ setelah itu diuji homogenitas untuk mengetahui data yang yang diperoleh telah homogen kemudian dilanjutkan dengan uji lanjutan *tukey LSD* untuk melihat perbedaan signifikan antar sampel (Suardi, 2019).