

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan kali ini yaitu dengan model penelitian eksperimental. Penelitian diawali dengan pembuatan ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* (L.)Vahl) untuk dilakukan skrining fitokimia agar diketahui metabolit sekunder yang ada pada ekstrak daun. Tahap selanjutnya, membandingkan kadar flavonoid total antara ekstrak hasil maserasi dan digesti serta dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dengan metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2- Picrylhidrazyl*). Parameter yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada pembuatan ekstrak daun pecut kuda dengan metode DPPH yaitu berdasarkan nilai IC_{50} .

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan simplisia dan pengujian standarisasi simplisia dilakukan di tempat tinggal dan Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
4. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
5. Uji antioksidan dengan metode DPPH dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini yaitu:

1. Ekstraksi

- a. Metode ekstraksi maserasi yaitu proses ekstraksi tanpa pemanasan dengan mencampurkan serbuk simplisia yang direndam dengan etanol 96% di dalam wadah tertutup rapat pada suhu ruang selama 3 hari.
- b. Metode digesti yaitu maserasi menggunakan pemanasan lemah (40-50°C) kemudian mencampurkan serbuk simplisia dengan pelarut etanol 96% selanjutnya diletakkan di atas *hot plate* diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 3 jam.

2. Uji kadar flavonoid total

Uji yang dilakukan dengan pereaksi asam asetat dan $AlCl_3$ ekstrak daun pecut kuda dengan variasi metode ekstraksi menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

3. Uji aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH berdasarkan nilai IC_{50} .

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi daun pecut kuda yaitu maserasi selama 3 hari dan digesti selama 3 jam.
2. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu metabolit sekunder, kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH berdasarkan nilai IC_{50} .
3. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah cahaya, suhu, serta panjang gelombang absorbansi, *operating time* pada setiap perlakuan.

E. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan berbagai macam alat yaitu alat ekstraksi (pisau, nampan, blender (Miyako), ayakan 40 mesh, kain flannel, toples, batang pengaduk, *rotary evaporator (RE 100-Pro)*, *waterbath*, spektrofotometer UV-1900, timbangan analitik (ohaus), oven (memmert UN-30), kuvet, aluminium foil, corong kaca, cwn porselen, tabung reaksi (iwaki), pipet volume 1 mL, pipet tets, labu ukur 10 mL, labu ukur 25 mL, dan labu ukur 100 mL

b. Bahan yang digunakan

Bahan-bahan dalam penelitian ini adalah daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl) yang diperoleh di daerah Ungaran Timur, etanol 96%, etanol p.a, kalium dikromat, H_2SO_4 pekat, HCl pekat, amilalkohol, aquades, aluminium klorida, $FeCl_3$ 3%, $FeCl_3$ 1%, magnesium (Mg), asam klorida (HCl), COOH glacial, kloroform, ammonia, preaksi Mayer, Dragendorff, aluminium klorida, asam asetat 5%, DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) dan kuersetin.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika (FMS) Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).

3. Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Pecut Kuda

Pada tahap pembuatan simplisia daun pecut kuda dilakukan dengan pemanenan di daerah Ungaran Timur. Daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl) yang dipanen yaitu daun yang masih segar dan berwarna hijau dan setelah itu dilakukan sortasi basah dengan cara memilah daun pecut kuda yang tidak diinginkan, kemudian dicuci

dengan air mengalir, dan ditiriskan hingga tidak ada air yang menetes, selanjutnya perajangan dengan memotong daun menjadi beberapa bagian kecil agar mempermudah proses pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan menggunakan sinar matahari tidak langsung ditutup dengan kain hitam. Setelah pengeringan dilakukan, kemudian melakukan sortasi kering. Tahap selanjutnya penghalusan menggunakan blender kemudian diayak dengan ayakan 40 mesh agar diperoleh serbuk halus.

4. Penetapan Kadar Air Simplisia Daun Pecut Kuda

a. Uji kadar air simplisia

Pada metode penentuan kadar air ini menggunakan metode gravimetri, dengan prinsip untuk penguapan air yang terdapat pada sampel dengan suhu 105°C. kemudian panaskan krus porselin selama 30 menit selanjutnya di dinginkan pada desikator. Langkah selanjutnya menimbang 2 gram simplisia ke dalam krus porselin dan dikeringkan selama 3 jam dengan suhu 105°C dan ditimbang kembali. Proses pengeringan kemudian dilanjutkan dan ditimbang pada jarak selang waktu 1 jam. Selanjutnya jumlah kadar air yang ditetapkan untuk menjaga mutu simplisia adalah <10% (Wijanarko *et al.*, 2020) Perhitungan kadar air dengan persamaan berikut:

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

keterangan :

a = bobot sampel sebelum pemanasan (g)

b = bobot sampel setelah pemanasan (g)

b. Uji Kadar Abu Total

Uji kadar abu total simplisia daun pecut kuda dilakukan dengan cara menimbang 2 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam krus porselin yang telah dipijarkan dan ditimbang. Krus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, pijaran dilakukan suhu 600°C, selama 3 jam kemudian didinginkan dan ditimbang hingga

diperoleh bobot tetap. Perhitungan kadar abu dihitung menggunakan persamaan berikut (Wijanarko *et al.*, 2020). Syarat nilai kadar abu pada simplisia daun pecut kuda yaitu dengan nilai <10% (Tuapattinaya *et al.*, 2021).

$$\text{kadar abu (\%)} = \frac{W1-W2}{W} \times 100\%$$

keterangan :

W1= bobot wadah dan sampel sesudah pengabuan (g)

W2= bobot wadah kosong (g)

W= bobot sampel sebelum dilakukan pengabuan (g)

5. Pembuatan Ekstrak Daun Pecut Kuda

a. Tahap ekstraksi maserasi

Sebanyak 300 gram daun pecut kuda yang telah dihaluskan di maserasi dengan etanol 96% sebanyak 1500 mL selama 3 hari. Setelah itu campuran disaring dengan kain flannel untuk memisahkan ampas dan filtratnya. Filtrat yang didapat diuapkan dan dipekatkan Filtrat yang telah dihasilkan tersebut kemudian dipekatkan dengan *ratory evaporator* pada suhu 50°C yang dilanjutkan dengan menggunakan *waterbath* sampai diperoleh ekstrak kental (Nudiasari *et al.*, 2019).

b. Tahap ekstraksi digesti

Sebanyak 300 gram daun pecut kuda yang telah dihaluskan, didigesti dengan etanol 96% sebanyak 1500 mL. campuran diuapkan dengan *hot plate* pada suhu 40°C - 50°C selama 3 jam pada kecepatan 1000 rpm setelah itu campuran disaring dengan kain flannel untuk memisahkan ampas dan diambil filtratnya. Filtrat yang telah dihasilkan tersebut kemudian dipekatkan dengan *ratory evaporator* pada suhu 50°C yang dilanjutkan dengan menggunakan *waterbath* sampai diperoleh ekstrak kental (Nudiasari *et al.*, 2019).

6. Perhitungan Nilai Rendeman Ekstrak

Perhitungan nilai rendemen dilakukan untuk setiap ekstraksi. Ekstrak yang sudah kental kemudian dihitung presentase rendemen yang diperoleh dari hasil perhitungan berat ekstrak kental dibagi dengan berat awal sampel (berat simplisia) dalam satuan persen (Jumawardi *et al.*, 2021). Berikut perhitungan menggunakan persamaan:

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak kental (gram)}}{\text{berat sampel awal (gram)}} \times 100\%$$

7. Kadar Air Ekstrak

Penetapan kadar air menggunakan alat *moisture balance* dengan cara menimbang 2 gram ekstrak daun pecut kemudian dimasukkan ke dalam lempeng logam, diratakan. Tunggu sampai alat berbunyi yang menandakan analisis sudah selesai (Aini *et al.*, 2023).

8. Pengujian Bebas Etanol

Ekstrak daun pecut kuda diambil sebanyak 1 gram kemudian ditambahkan 1 mL kalium dikromat dan 2 tetes H₂SO₄ pekat (Adiningsih *et al.*, 2021). Syarat uji bebas etanol, ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester dan terbentuk warna kecoklatan (Pujiastuti & Nurani, 2023).

9. Parameter Spesifik Ekstrak Daun Pecut Kuda

a. Uji Organoleptik

Pada pengujian organoleptik dilakukan dengan pengenalan secara fisik dengan menggunakan panca indera dalam mendeskripsikan bentuk, bau, warna, rasa, ukuran (Maryam *et al.*, 2020).

b. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Pecut Kuda

Skrining fitokimia ekstrak daun pecut kuda menggunakan maserasi dan digesti

1) Flavonoid

Sebanyak 0,1 g ekstrak daun pecut kuda dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 mL HCl pekat, kemudian tambahkan 1 mL amilalkohol, dan 0,1 g serbuk Mg kemudian dikocok dengan kuat. Hasil uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amilalkohol (Jumawardi *et al.*, 2021).

2) Fenolik

Sebanyak 0,5 g ekstrak daun pecut kuda dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 mL aquades, lalu panaskan sampai mendidih selama 2 menit, selanjutnya dinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambah 2 tetes larutan FeCl₃ 1% jika terbentuk warna hijau atau hitam kehijauan menunjukkan adanya fenolik (Jumawardi *et al.*, 2021).

3) Tanin

Dilartukan sebanyak 0,1 g ekstrak daun pecut kuda dalam 10 mL aquades dan dididihkan selanjutnya sampel disaring, filtrat yang diperoleh diambil 2 mL kemudian ditambah dengan 1 mL FeCl₃ 1%. Adanya endapan hijau kehitaman menandakan adanya tanin (Jumawardi *et al.*, 2021).

4) Saponin

Sebanyak 1 mg ekstrak daun pecut kuda dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan 10 mL air dan dikocok kuat-kuat selama 10 menit sampai terbentuk busa. Pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, apabila buih tidak hilang, maka ekstrak positif mengandung saponin (Jumawardi *et al.*, 2021)

5) Triterpenoid dan steroid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan COOH glacial sebanyak 10 tetes dan H₂SO₄ pekat sebanyak 2 tetes, kemudian larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Apabila larutan positif pada terpenoid jika larutan berubah warna merah atau ungu, dan jika larutan berubah warna menjadi warna biru atau hijau maka positif pada steroid (Rante *et al.*, 2020).

6) Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun pecut kuda dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 mL kloroform secukupnya dan 10 mL amonia kemudian ditambahkan 10 tetes H₂SO₄. Campuran dikocok dan dibiarkan hingga membentuk 2 lapisan. Lapisan H₂SO₄ dipindahkan dalam 2 tabung reaksi dengan volume masing-masing 2,5 mL. tabung pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer, terbentuknya endapan putih kekuningan menunjukkan adanya alkaloid. Tabung kedua ditambah 3 tetes pereaksi Dragendorff, terbentuknya endapan warna merah jingga. menunjukkan adanya alkaloid (Rante, 2020).

10. Uji Penetapan Kadar Flavonoid Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

a. Pembuatan Reagen AlCl₃ 10%

Ditimbang 10 mg serbuk kemudian dilarutkan menggunakan aquades hingga tanda batas labu ukur 10 mL (Bachtiar *et al.*, 2023).

b. Pembuatan Larutan Asam Asetat 5%

Ditimbang sebanyak 5 mL asam asetat kemudian dilarutkan menggunakan aquades hingga tanda batas 100 mL (Bachtiar *et al.*, 2023).

c. Pembuatan Larutan Blanko

Diambil etanol p.a sebanyak 2 mL, 0,1 mL AlCl_3 10% dan 0,1 mL asam asetat, kemudian ditambahkan aquades pada labu ukur 10 mL sampai tanda batas (Bachtiar *et al.*, 2023).

d. Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

Ditimbang serbuk 25 mg baku kuersetin dan dilarutakn dalam 25 mL etanol p.a didapatkan 1000 ppm (Bachtiar *et al.*, 2023).

e. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Diambil larutan kuersetin 1000 ppm sebanyak 1 mL, diencerkan dengan etanol p.a sebanyak 10 mL didapatkan 100 ppm. Kemudian diambil 1 mL larutan standar ditambahkan 1 mL AlCl_3 10% kemudian ditambahkan 8 mL larutan asam asetat 5% diamkan selama 16 menit (Bakti *et al.*, 2017). Selanjutnya dilakukan pembacaan panjang gelombang kuersetin dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400-500 nm (Nintiasari & Ramadhani, 2022)

f. Penentuan *Operating Time* Kuersetin

Larutan kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL larutan asam asetat 5%. Selanjutnya larutan tersebut dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit sampai serapan stabil (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

g. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan baku kuersetin 1000 ppm diencerkan menjadi seri kadar 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm dan 120 ppm. Pipet 1 mL larutan standar dari masing-masing konsentrasi kemudian tambahkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL larutan asam asetat. Selanjutnya diinkubasi selama waktu yang ditentukan dan diukur absorbansinya

menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

h. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Ekstraksi maserasi dan digesti dibuat dengan larutan konsentrasi 1000 ppm dengan cara mengambil ekstrak sebanyak 10 mg dilarutkan dengan etanol p.a 10 mL, kemudian diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL $AlCl_3$ dan 8 mL larutan asam asetat. Selanjutnya diinkubasi selama waktu yang telah ditentukan dan ukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan dilakukan 3 kali replikasi (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

i. Perhitungan Kadar Flavonoid

Untuk menghitung kadar flavonoid pada daun pecut kuda dapat dihitung dari nilai absorbansi yang diperoleh dari kelima konsentrasi kuersetin dengan menggunakan persamaan regresi linier : $y = a + bx$.

Keterangan : y = absorbansi
 x = konsentrasi
 a = *intercept* (perpotongan garis)
 b = *slope* (kemiringan)

Penentuan hasil penetapan kadar flavonoid dalam sampel dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Oktaria 2023):

$$\text{Rumus : } C = \frac{C_1 \times V \times Fp}{m} \times 100\%$$

Keterangan : C = Total Flavonoid (mg/g)
 C_1 = Konsentrasi Kuersetin (mg/L)
 V = Volume Sampel (L)
 M = Berat Sampel (g)
 Fp = Faktor Pengenceran

11. Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

a. Pembuatan Larutan Baku DPPH

Ditimbang serbuk DPPH sebanyak 15,8 mg dan dimasukkan kedalam labu ukur takar 100 mL, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 0,04 mM (Nintiasari & Ramadhani, 2022)

b. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Diambil sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,04 Mm dan ditambahkan 4 mL etanol p.a sampai tanda batas labu ukur 5 mL, kemudian diinkubasi selama beberapa menit pada tempat yang gelap. Selanjutnya diukur absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm (Nintiasari & Ramadhani, 2022). Panjang gelombang maksimum pengukuran sampel menggunakan metode DPPH yaitu 515-520 nm (Tenda *et al.*, 2023).

c. Pembuatan Larutan Blanko

Cara pembuatan larutan blanko dengan cara menambahkan larutan DPPH sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 4 mL etanol p.a ke dalam labu ukur 5 mL. Selanjutnya serapan larutan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Susiloningrum & Mugita Sari, 2021).

d. Penentuan *Operating Time* DPPH

Penentuan *Operating Time* dengan cara mengambil 1 mL larutan DPPH 0,04 Mm dan tambahkan etanol p.a sampai tanda batas labu ukur 5 mL. selanjutnya larutan tersebut diukur absorbansinya pada gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit sampai serapan stabil (Susiloningrum & Mugita Sari, 2021).

e. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Kuersetin

Kurva baku diawali dengan pembuatan larutan baku kuersetin 1000 ppm dengan cara menimbang sebanyak 25 mg kuersetin kemudian dilarutkan sebanyak 25 mL etanol p.a. Setelah itu larutan baku diencerkan menjadi larutan seri kadar dengan kadar 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm. Sebanyak 1 mL larutan standart DPPH 0,04 mM, kemudian tambahkan 1 mL larutan standar kuersetin dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 5 mL, selanjutnya diinkubasi di tempat yang gelap selama 15 menit, setelah itu pembacaan absorbansi seri kadar menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan gelombang maksimum (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

f. Pengujian Aktivitas Antioksidan Daun Pecut Kuda

Menimbang sebanyak 100 mg ekstrak pekat hasil setiap metode ekstraksi maserasi dan digesti kemudian dilarutakn dengan etanol sebanyak 100 mL kemudian didapatkan 1000 ppm. Selanjutnya larutan daun pecut kuda menggunakan metode maserasi dan digesti diencerkan menjadi seri kadar konsentrasi sebesar 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm kemudian masukkan kedalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan etanol p.a sampe tanda batas, Masing- masing konsentrasi diambil 1 mL dimasukkan ke dalam labu ukur, lalu tambahkan 1 mL DPPH 0,04 mM dan ditambahkan etanol p.a pada labu ukur 5 mL, kemudian diingkubasi selama masa *operating time* kemudian masing-masing kadar seri diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

F. Analisis Data

Data yang diperoleh selanjutnya dihitung kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan menggunakan persamaan linear $y = bx + a$. Tujuan regresi linear untuk membuat perkiraan atau prediksi nilai suatu variabel (variabel penden / terikat) melalui variabel yang lain (variabel independent / bebas) (Rizikiyan & Pandanwangi, 2019). Analisis data yang diperoleh dari uji flavonoid dan uji aktivitas antioksidan daun pecut kuda dengan metode ekstraksi maerasi dan digesti dianalisis menggunakan SPSS dengan uji *oneway* ANOVA. Namun, langkah pertama yang dilakukan ialah uji normalitas terlebih dahulu untuk mengetahui data yang diperoleh telah berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro Wilk* dikarena sampel kurang dari 50, suatu data yang dikatakan berdistribusi normal dengan nilai signifikan $>0,05$ (Fiqih Sabilillah *et al.*, 2016).