

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman sukun (*Artocarpus altilis* F.) diambil di kawasan Bibis Luhur, Nusukan, Surakarta, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun - daun tanaman sukun yang masih segar diambil di daerah Bibis Luhur, Nusukan, Surakarta, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Identifikasi variabel utama mencakup dari seluruh sampel yang digunakan. Variabel utama pertama didalam penelitian ini adalah adanya aktivitas antioksidan dari ekstrak daun sukun, fraksi n-heksan, etil-asetat, dan air terhadap DPPH.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi terdahulu dapat dikelompokkan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

3. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang dilakukan penyelidikan untuk mempelajari pengaruhnya terhadap suatu variabel terkait. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi dari ekstrak etanol daun sukun (*Artocarpus altilis* F.)

4. Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah variabel akibat dari variabel utama. Variabel tergantung yang dimaksud adalah berupa uji aktivitas antioksidan daun sukun (*Artocarpus altilis* F.) Daya antioksidan fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun sukun

5. Variabel terkendali

Variabel terkendali adalah variabel yang dianggap mempengaruhi variabel terikat lainnya. Variabel terkendali dalam

penelitian ini adalah radikal bebas dari DPPH, kualitas dari bahan simplisia dan serbuk daun sukun dan alat yang digunakan.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pisau, timbangan kg digital, talenan, tampah, blender, baskom, sendok, ayakan mesh 40, plastik, bejana maserasi, kain flanel, kertas saring, *evaporator rotary*, jar kosong, timbangan gram digital, cawan, timbangan mg digital, pipet tetes, corong pisah, Beker glass, gelas ukur, *waterbath*, spektrofotometer UV-VIS, kuvet, pipet volum, vial, corong, labu ukur 100 ml, labu ukur 5 ml, labu ukur 10 ml, alumunium foil, pompa pipet, batang pengaduk, *moisture balance*, labu alas bulat, *bidwell sterling*, kurs, oven, desikator, dan tabung reaksi.

2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun sukun yang didapatkan dari kawasan Bibis Luhur, Nusukan, Surakarta, Jawa Tengah, etanol 70%, serbuk DPPH, etanol p.a, aquadest, n-Heksan, etil asetat, ekstrak etanol, kuersetin, toluene jenuh, HCL pekat, amil alkohol, HCL2N, FeCl3, dragendroff.

D. Jalanya Penelitian

1. Determinasi daun sukun

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun sukun berdasarkan ciri-ciri morfologisnya yang ada pada daun sukun, determinasi dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Determinasi ini bertujuan untuk memastikan bahwa memang benar sampel yang digunakan adalah daun sukun

2. Persiapan bahan

Daun sukun didapatkan dari petani di desa Biblis Luhur, Kabupaten Surakarta, Daun sukun di Sortir untuk memilih daun yang sesuai kriterian kemudian dicuci untuk menghilangkan kotoran pada daun, setelah itu daun dicuci terlebih dahulu, lalu diiris dan keringkan, kemudian tahapan akhir adalah digiling untuk mendapatkan serbuk daun sukun.

3. Pembuatan serbuk daun sukun

Daun sukun yang digunakan dipilih dalam keadaan segar, bersih dan bebas dari kotoran. Daun yang sudah disiapkan kemudian dicuci

menggunakan air mengalir hingga bersih. Setelah itu, dirajang halus dan dilakukan pengeringan dengan panas sinar matahari hingga kering. Daun sukun yang sudah kering dihaluskan menjadi serbuk dan diayak menggunakan ayakan mesh 40, serbuk daun sukun diukur kelembabannya menggunakan alat *moisture balance*.

4. Pengukuran Susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan dengan metode susut pengeringan menurut Farmakope Herbal Indonesia, menimbang kurang lebih 2 g sampel dimasukkan dalam *moisture balance* pada suhu 105°C ditunggu sampai pemanasan selesai. Pengeringan dan penimbangan pada durasi 1 jam hingga perbedaan antara 3 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 10 % (Mat Saad *et al.*, 2023)

Susut pengeringan dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{bobot sebelum pengeringan} - \text{bobot setelah pengeringan}}{\text{bobot sebelum pengeringan}} \times 100\%$$

5. Penetapan kadar air pada serbuk

Penetapan kadar air pada serbuk etanol daun sukun 20 gram dilakukan dengan cara destilasi menggunakan alat *Bidwell Sterling*. Caranya dengan menimbang serbuk daun sukun sebanyak 20 gram dimasukkan dalam labu alas bulat *Bidwell Sterling* ditambahkan dengan toluen 200 ml dan toluen dijenuhkan dengan toluen 20 ml lalu dipanaskan selama 15 menit, saat toluen mendidih destilasi diatur menjadi 2 tetes per detik sehingga lebih banyak air yang tersuling. Tingkatkan kembali kecepatan menjadi 4 tetes per detik. Membersihkan bagian pendingin dan tabung yang terhubung dengan kawat menggunakan sikat dan toluen jenuh air saat semua air tersuling. Destilasi dilakukan selama 5 menit. Tabung penerima didinginkan sampai suhu kamar, apabila masih terdapat tetesan yang menempel maka dilakukan penggosokan pada tabung pendingin, rekatkan tabung penerima dengan kawat tembangga, setelah itu basahi dengan toluen jenuh air sampai tetesan air yang menempel tersebut jenuh. Volume air setelah air dan toluen terpisah secara sempurna dapat dihitung kadar airnya dalam satuan % v/b menggunakan rumus (Lin *et al.*, 2009):

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

6. Pembuatan ekstrak daun sukun

Pembuatan ekstrak daun sukun dilakukan menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 70%. Memasukkan 1 bagian serbuk simplisia/daun sukun ke dalam bejana maserasi lalu tambahkan 10 bagian pelarut etanol 70% (1:10). Diamkan simplisia selama 6 jam

pertama sambil diaduk sesekali lalu diampkan simplisia tersebut selama 18 jam. Saring hasil maserat yang didapat lalu mengulangi proses penyarian dengan volume pelarut setengah dari penyarian pertama. Hasil maserat yang didapat dikumpulkan lalu diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak yang cukup kental. Hasil yang diperoleh dihitung rendemennya dengan rumus :

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

7. Uji kadar air ekstrak menggunakan kurs

Pengujian kadar air ekstrak mempunyai tujuan yaitu untuk mengetahui bobot konstan kadar air ekstrak yang didapatkan dengan menggunakan metode gravimetri atau kurs. Langkah awal, menimbang kurs yang kosong kemudian dimasukkan ke dalam oven kurang lebih 15 menit. Kemudian dimasukkan kedalam desikator untuk didinginkan selama kurang lebih 15 menit. Langkah selanjutnya menimbang ekstrak sebanyak 10 gram ke dalam kurs, kemudian ekstrak yang telah dimasukkan ke dalam kurs, kemudian di oven kembali selama 5 jam setelah itu didinginkan dengan menggunakan desikator selama 1 jam kemudian ditimbang, dan dicatat hasilnya (Harmanto, 2012).

Timbang ekstrak yang telah dimasukkan kedalam kurs, kemudian dioven kembali selama 3 jam. Dinginkan menggunakan desikator selama 15 menit. Dan ditimbang kembali lalu dicatat hasil yang didapatkan. Ekstrak kembali ke dalam oven selama 1 jam kemudian dimasukkan kedalam desikator, ditimbang dan dicatat kembali hasilnya.

8. Pembuatan fraksinasi ekstrak daun sukun

Fraksinasi dilakukan dengan menimbang ekstrak daun sukun 20 gram. Fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan air. Prosedur fraksinasi dilakukan dengan menggunakan corong pemisah untuk membentuk dua lapisan cair yang terpisah, lapisan air bawah dan lapisan heksana atas. Fraksi n-heksana yang diperoleh diuapkan pada *rotary evaporator*. Residu yang diperoleh dari fraksi n-heksana selanjutnya 3 dengan jumlah etil asetat yang sama dengan pelarut yang digunakan untuk dispersi sampai terbentuk dua lapisan yang terpisah dengan jelas, lapisan air bawah dan lapisan atas etil asetat. Fraksi etil asetat dan air diuapkan pada suhu 40°C menggunakan *rotary evaporator* (Purnamasari *et al.*, 2018).

9. Penetapan organoleptis

Ekstrak daun sukun dilakukan dengan cara melihat suatu bentuk, bau, warna, dari suatu ekstrak daun sukun.

10. Skrining fitokimia serbuk daun sukun

10.1 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 0,1 gram serbuk daun sukun dimasukan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 ml HCl pekat dan 2 ml amil alkohol, kemudian dikocok kuat dan dibiarkan sampai memisah. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Misfadhila *et al.*, 2019).

10.2 Identifikasi saponin. Sebanyak 0,1 gram serbuk daun sukun dimasukan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air panas, dikocok kuat selama 10 detik. Hasil positif saponin ditandai dengan terbentuknya buih atau busa selama kurang lebih 10 menit setinggi 1 - 10 cm yang kemudian ditambahkan 1 tetes HCl 2 N, jika buih tersebut tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Misfadhila *et al.*, 2019).

10.3 Identifikasi tannin. Sebanyak 0,1 gram serbuk daun sukun dimasukan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 2 – 3 tetes FeCl₃. Hasil positif tannin ditandai dengan terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman (Misfadhila *et al.*, 2019).

10.4 Identifikasi alkaloid. Sebanyak 0,1 gram serbuk daun sukun dimasukan ke dalam tabung reaksi, kemudian diteteskan 2 tetes pereaksi Dragendroff menghasilkan endpan merah bata, pada penambahan 2 tetes pereaksi mayer menghasilkan endapan putih atau kuning, sedangkan pada penambahan 2 tetes pereaksi Bouchardat menghasilkan endapam coklat kehitaman. Hasil positif alkaloid ditunjukkan jika terjadi endapan paling sedikit dua tau tiga dari percobaan tersebut (Misfadhila *et al.*, 2019).

10.5 Identifikasi fenolik. Uji fenolik dilakukan dengan mengambil 0,1 Gram serbuk daun sukun dimasukan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 2 tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif jika berubah menjadi biru kehitaman (Misfadhila *et al.*, 2019).

11. Pengujian aktivitas antioksidan

8.1 Pembuatan larutan DPPH. Larutan DPPH dibuat dengan cara menimbang DPPH sebanyak 15,8 mg dilarutkan dengan 100 ml etanol pro analysis (p.a) dalam labu tentukur. Larutan DPPH dijaga dalam temperatur rendah dan terlindung cahaya (Handayani *et al.*, 2014).

8.2 Pembuatan larutan uji. Larutan uji ekstrak dan fraksi dibuat dengan cara menimbang fraksi daun sukun dan ekstrak daun

sukun (*Artocarpus altilis* F.) sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan etanol pro analysis (p.a) sambil diaduk dan di homogenkan lalu dicukupkan volumenya hingga 100 ml hingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm. Pelarutan ekstrak digojok terus menerus agar ekstrak dapat larut seluruhnya. Lakukan pengenceran dengan variasi konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm dengan cara memipet sejumlah tertentu larutan induk kemudian ditambahkan dengan etanol pro analysis (p.a) hingga diperoleh beberapa konsentrasi larutan uji akhir untuk masing-masing ekstrak (Nugroho, 2017).

8.3 Penetapan panjang gelombang maksimum DPPH.

Penentuan panjang gelombang (λ) maksimum larutan DPPH untuk uji aktivitas antioksidan ekstrak daun sukun dilakukan sebagai berikut: larutan DPPH sebanyak 1 ml ditambah dengan 4,0 ml etanol p.a, kemudian dikocok homogen dan diamati serapannya pada rentang 500-600 nm setelah pendiaman selama 30 menit pada spektrofotometri UV-Vis.

8.4 Penentuan *Operating time* (OT). Optimasi waktu inkubasi dilakukan untuk mengetahui waktu optimum saat senyawa uji bereaksi dengan senyawa DPPH. Penentuan waktu inkubasi dilakukan dengan cara memipet 1ml sampel dan 1 ml larutan DPPH dari masing-masing larutan uji kuersetin, ekstrak dan fraksi ekstrak etanol daun sukun pada setiap konsentrasi, kemudian ditambahkan dengan larutan 3 ml etanol p.a. Nilai absorbansi selanjutnya diamati pada panjang gelombang maksimum yang didapat mulai dari menit ke-10 hingga menit ke-60 dengan selang waktu 10 menit (Nugroho, 2017).

8.5 Uji Aktivitas antioksidan. Larutan uji ekstrak daun sukun masing-masing dibuat 5 seri konsentrasi yaitu 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm, Dan 5 seri konsentrasi yaitu 2, 4, 6, 8, 10 ppm untuk sampel kuersetin. Setiap konsentrasi larutan uji dipipet sebanyak 1,0 mL, kemudian menambahkan larutan pereaksi DPPH sebanyak 1 ml dan 3 ml etanol p.a lalu dimasukkan kedalam flakon. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah ditetapkan.

8.6 Perhitungan Nilai IC₅₀.

Perhitungan Nilai IC₅₀ menggunakan persamaan :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{blanko}}} \times 100\%$$

Keterangan :

- A. Blanko: absorbansi DPPH (blanko) pada panjang gelombang maksimum.
- B. Sampel: absorbansi sampel dalam radikal DPPH pada panjang gelombang maksimum. Kemudian diperoleh % inhibisi dari setiap konsentrasi larutan uji selanjutnya dilakukan perhitungan regresi linier dengan persamaan : $y = bx + a$ Keterangan : $y =$ Persentase inhibisi (%) $x =$ Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)
- 40 Parameter aktivitas antioksidan yang digunakan dalam penelitian ini adalah nilai IC_{50} (Inhibisi Concentration 50%), dapat diartikan sebagai konsentrasi sampel yang dapat meredam 50% radikal DPPH (Agustina *et al.*, 2020). Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50, atau persamaan : $IC_{50} = (50 - a) / b$ (Tejowati, 2021).

E. Analisis Hasil

Hasil yang didapatkan dari uji aktivitas antioksidan ekstrak biji sukun menggunakan metode DPPH dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dari waktu yang didapat dari OT (*Operating Time*). Menentukan nilai aktivitas antioksidannya dengan menghitung IC_{50} (*Inhibitory Concentration*). Nilai IC_{50} dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ peredaman} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{abs sampel}}{\text{Abs sampel}} \times 100\%$$

Persen (%) tersebut dibuat kurva antara penangkal radikal bebas terhadap konsentrasi larutan uji. Persamaan regresi ditentukan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} yaitu konsentrasi inhibisi larutan uji yang mampu menangkal 50% radikal bebas. Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan linier dengan persamaan :

$$Y = aX + b$$

Persamaan linier yang dihasilkan digunakan untuk nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} adalah konsentrasi yang diperoleh sebesar 50 dari persamaan $Y = aX + b$. pada saat % inhibisi = 50, rumus menghitung nilai IC_{50} persamaannya menjadi :

$$50 = aX + b$$