

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan September sampai dengan bulan Desember 2019 di Laboratorium Kimia Universitas Katolik Widya Mandira Kupang dan Universitas Pendidikan Bandung.

3.2 Tempat Pengambilan Sampel

Sampel dari penelitian ini berupa daun Wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly) yang diambil dari Desa Ulupulu, Kabupaten Nagekeo.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Bahan

Bahan tumbuhan (sampel) yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly) asal Desa Ulupulu Kabupaten Nagekeo. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%, NaOH, silika gel 60, HgCl₂, n-heksan, etil asetat, aquades, NH₃, asam asetat anhidrat, reagen FeCl₃ 1%, kloroform amoniak, H₂SO₄ pekat, HCl pekat, NH₄OH, Benzena, metanol, kloroform, pereaksi Wagner, Mayer, dan Dragendroff, DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*), dan Vitamin C (asam askorbat).

3.3.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, pipet ukur, kertas saring, tisu plat silika gel G₆₀ F₂₅₄, neraca analitik, erlenmeyer, oven, desikator, hot plate, pipa kapiler, seperangkat peralatan gelas, lampu UV, plat tetes, statip, vial, corong buchner, pensil, mistar, chamber kromatografi, kromatografi kolom, spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer IR, rotary evaporator, aluminium foil, kertas saring, corong, kaca arloji, mistar, pensil.

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Pengumpulan dan Pengolahan Sampel

Sampel daun Wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly) yang masih muda dikumpulkan kemudian dikeringanginkan sampai kering. Sampel yang kering diblender hingga halus.

3.4.2 Ekstraksi Sampel

Sebanyak 250 g serbuk halus sampel daun Wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly) dimaserasi dengan pelarut etanol selama 24 jam, kemudian disaring. Filtrat dipindahkan ke wadah yang lain sedangkan residu yang diperoleh dimaserasi kembali menggunakan pelarut etanol yang baru. Maserasi dilakukan sebanyak 2 kali. Filtrat yang telah digabungkan lalu dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator sehingga menghasilkan ekstrak pekat. Setelah itu, ditimbang dan dihitung rendemennya.

Skrining Fitokimia

Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun Wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly) dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam sampel. Golongan-golongan senyawa yang dianalisis dengan prosedur analisis sebagai berikut:

a. Analisis Flavonoid dan Fenol

Sebanyak 0,1 g ekstrak kasar sampel daun Wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly) dilarutkan dalam 10 mL etanol, lalu dipanaskan pada suhu 50°C. Hasilnya dibagi ke dalam tiga tabung reaksi. Tabung pertama dibuat kontrol, tabung kedua ditambahkan H₂SO₄ pekat, tabung ketiga ditambahkan 1 mL NaOH. Bandingkan dengan kontrol. Bila terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman maka filtrat mengandung flavonoid dan warna hijau kecoklatan mengandung fenolik (Taher, 2011).

b. Uji saponin dan tanin

Sampel sebanyak 0,5 g ekstrak kasar daun Wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly) dilarutkan dengan 10 mL aquades kemudian dididihkan selama 5 menit. Campuran disaring dan filtrat dibagi ke dalam 2 tabung reaksi. Bagian pertama digunakan untuk uji saponin, filtrat didiamkan sampai agak dingin, kemudian dikocok kuat sampai timbul busa. Bila busa stabil dalam 5-10 menit maka filtrat positif mengandung saponin. Bagian kedua untuk uji tanin, filtrat ditambahkan FeCl₃ 1%. Bila dihasilkan warna hijau, biru, atau hitam maka filtrat positif mengandung tanin.

c. Analisa alkaloid

Sebanyak 0,1 g ekstrak kasar sampel daun Wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly) dilarutkan dalam 10 mL kloroform dan ditambah beberapa tetes NH_4OH kemudian disaring kedalam tabung reaksi tertutup. Fraksi kloroform diasamkan dengan 10 tetes H_2SO_4 2 M dikocok kuat kemudian lapisan atasnya dipindahkan dan dibagi ke dalam 3 tabung reaksi yang lain. Lapisan atas ini dipindahkan kedalam 3 tabung reaksi. Tabung 1 ditambahkan pereaksi meyer, tabung 2 ditambahkan pereaksi Wagner, dan tabung 3 ditambahkan pereaksi Dragendorf. Uji positif apabila terbentuk endapan dengan warna berturut-turut putih, coklat dan merah/jingga.

a. Analisis Triterpenoid dan Steroid

Sebanyak 0,1 g sampel dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 5 mL kloroform dan ditambahkan dengan 5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini selanjutnya ditambahkan dengan 1-2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut maka ekstrak tersebut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika hasil yang diperoleh terbentuk warna hijau kebiruan maka ekstrak tersebut menunjukkan adanya

3.4.3 Fraksinasi Ekstrak Etanol Secara Kolom Kromatografi

Fraksinasi ekstrak pekat etanol daun Wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly) diawali dengan tahap Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dan dilanjutkan tahap kromatografi kolom.

a. Tahap Kromatografi Lapis Tipis

Disiapkan 6 jenis pelarut organik dengan perbedaan kepolaran yakni: (1) pelarut polar yang terdiri dari metanol, etanol; (2) semi polar yang terdiri dari etil asetat, dan (3) non polar yang terdiri dari kloroform, n-heksan, dan benzena. Ekstrak sampel ditimbang sebanyak 2 gram dan dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Ekstrak sampel kemudian ditotolkan pada plat KLT berukuran (10×1) cm dan dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi suatu pelarut tunggal. Plat KLT yang dimasukkan ke dalam gelas kimia berisi pelarut diletakkan pada posisi tegak dan permukaan pelarut berada di bawah garis batas penotolan sampel. Setelah pelarut menyerap pada plat KLT secara vertikal mencapai garis batas atas maka plat KLT dikeluarkan dari dalam gelas, dan dikeringkan kemudian diamati di bawah lampu UV. Tahap ini dilakukan terhadap tiap jenis pelarut organik yang tersedia.

Pengamatan terhadap spot pada KLT dari tiap larutan uji menjadi dasar untuk penentuan eluen, baik eluen tunggal maupun kombinasi pelarut dengan perbandingan tertentu. Eluen yang baik yang diperoleh melalui tahap ini adalah yang menghasilkan pemisahan spot secara tegas, yang kemudian digunakan pada tahap fraksinasi secara kromatografi kolom.

b. Tahap Kromatografi Kolom

Silika gel 60 ditimbang sebanyak 40 gram dan dilarutkan dengan pelarut eluen yang diperoleh pada tahap KLT. Larutan silika gel tersebut dimasukan secara perlahan ke dalam kolom hingga setinggi 20 cm. Ditimbang 2 gram ekstrak kental etanol lalu dilarutkan dengan pelarut yang dijadikan sebagai eluen

sebanyak 10 mL dan dimasukkan secara perlahan pada permukaan kolom yang telah dipadati oleh silika gel. Selanjutnya, larutan eluen ditambahkan secara perlahan-lahan. Eluat ditampung pada botol vial dengan volume 3 mL. Jumlah tabung reaksi yang disediakan sebanyak 40 buah.

Fraksi-fraksi dari tiap tabung reaksi diidentifikasi kembali dengan KLT. Fraksi yang memberikan tampilan noda yang sama atau nilai Rf yang sama dihimpun atau disatukan menjadi satu kelompok fraksi. Tiap kelompok fraksi dipisahkan melalui evaporasi, dan diidentifikasi senyawanya melalui spektrofotometri UV-Vis dan spektrofotometri IR.

3.5 Pengujian Antioksidan

Pengujian antioksidan dilakukan secara kuantitatif, yang diawali dengan pembuatan larutan DPPH, pembuatan variasi konsentrasi sampel ekstrak etanol daun Wulukula dan pembanding (vitamin C), serta Pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

a. Pembuatan larutan DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil)

pembuatan radikal DPPH 0,4 mM

Serbuk DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil) sebanyak 0,0079 gram (BM 394,32) dilarutkan dalam etanol p.a 15 mL kemudian dimasukkan dalam labu 50 mL volume dicukupkan dengan menggunakan etanol p.a sampai tanda batas (DPPH 0,4 mM)

b. Penentuan panjang gelombang maksimum blanko

Larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan pelarut etanol p.a 4 mL dan diinkubasi selama 30 menit. Larutan yang terbentuk dituang ke dalam kuvet dan diukur panjang gelombang maksimumnya pada kisaran 400-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

c. Uji antioksidan pembanding

1. Pembuatan larutan induk konsentrasi 1000 ppm

Ditimbang sebanyak 0.1 gram vitamin C dan dilarutkan dengan sedikit aquades kemudian dimasukkan kedalam labu tentukur 100 mL kemudian dicukupkan volumenya hingga tanda batas menggunakan etanol p.a.

2. Pembuatan larutan pembanding dengan seri konsentrasi 0.5, 1, 2.5, dan 5 ppm

Dari larutan induk 1000 ppm dipipet 125×10^{-4} mL, 25×10^{-3} ml, 625×10^{-4} mL, dan 125×10^{-3} mL, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas.

3. Pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Sebanyak 4 mL larutan pembanding (vitamin C) masing-masing konsentrasi dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL. Campuran ini kemudian diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum

d. Uji antioksidan ekstrak sampel

1. Pembuatan larutan induk 1000 ppm

Ekstrak kasar daun wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly) ditimbang 0,1 gram dan dilarutkan dengan sedikit etanol, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL. Ditambah etano hingga tanda batas

2. Pembuatan larutan seri konsentrasi 25, 50, 100, 150, dan 250 ppm

Larutan induk 1000 ppm dipipet 0.625 mL, 1.25 mL, 2.5 mL, 3.75 mL, dan 6.25 mL, dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL, lalu ditambahkan etanol hingga tanda batas.

3. Pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Sebanyak 4 mL larutan uji ekstrak kasar masing-masing konsentrasi dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan dengan larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL, dan diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum

e. Penentuan persen inhibisi

Aktivitas penangkal radikal diekspresikan sebagai persen inhibisi yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi radikal DPPH} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorban blanko}} \times 100\%$$

f. Penentuan nilai IC₅₀

Konsentrasi sampel dan persen inhibisi masing-masing pada sumbu X dan Y pada persamaan regresi linear. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dari masing-masing nilai dinyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai X yang akan diperoleh sebesar IC₅₀. Dengan persamaan: $y = ax + b$