

BAB II

METODOLOGI PENELITIAN

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antioksidan dari daun sirih hitam, yang terdiri dari beberapa tahapan yaitu penyiapan bahan, determinasi, pembuatan simplisia, pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik, penetapan parameter, penapisan fitokimia, ekstraksi dengan metoda maserasi menggunakan 3 pelarut berbeda kepolaran secara bertingkat (n-heksana, etil asetat dan etanol), pengujian kualitatif aktivitas antioksidan dengan kromatografi lapis tipis, dan pengujian kuantitatif aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH menggunakan spektrofotometer UV sinar tampak.

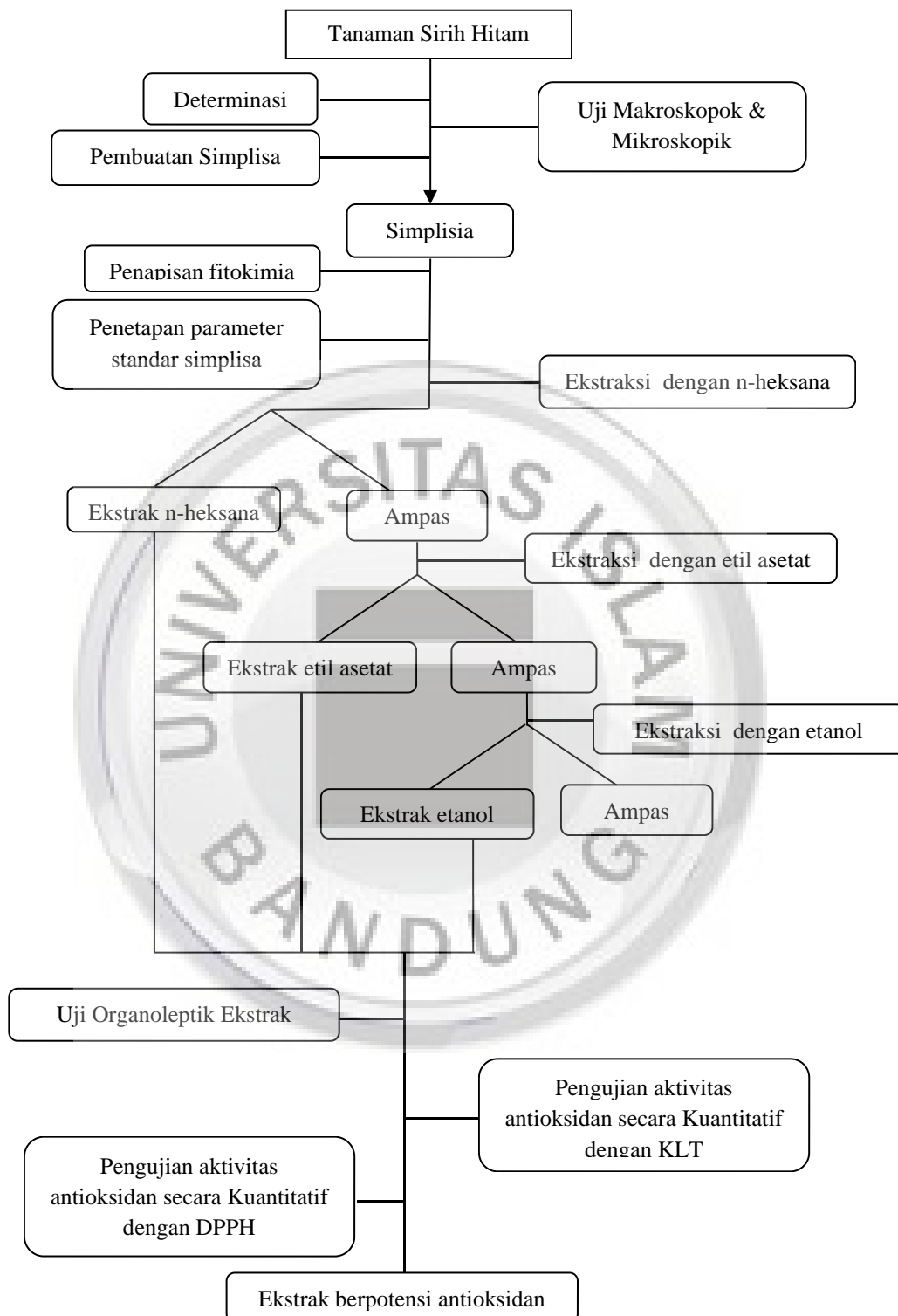
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih hitam (*Piper acre* Blume.) yang berumur 5 bulan dan warna daun yaitu hijau tua atau kehitam-hitaman. Pemilihan jenis tumbuhan sirih hitam dilakukan berdasarkan pengetahuan dan informasi dari masyarakat lokal. Selanjutnya dilakukan pemastian identitas bahan melalui determinasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor.

Pembuatan simplisia dilakukan dengan proses sortasi basah, pencucian, pengeringan dan penggilingan hingga diperoleh serbuk simplisia. Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, kuinon, saponin, tanin, polifenolat, monoterpen/seskuiterpen dan steroid/triterpenoid. Penetapan standar dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak, pada simplisia dilakukan penetapan kadar air, kadar abu total dan kadar abu tidak

larut asam. Sedangkan pada ekstrak dilakukan penetapan rendemen ekstrak dan bobot jenis ekstrak. Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstraksi bertingkat menggunakan maserasi dengan pelarut berdasarkan tingkat kepolaran yaitu n-heksana, etil asetat dan etanol yang bertujuan untuk memisahkan komponen senyawa yang terkandung dalam daun sirih hitam sejak awal, agar penetapan terhadap berpotensi sebagai antioksidan dapat diteliti dengan jelas.

Pengujian ekstrak dilakukan terhadap ketiga ekstrak yang diperoleh secara kualitatif dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan senyawa kuersetin sebagai pembanding. Bercak yang muncul pada plat KLT untuk menganalisis secara kualitatif terhadap keberadaan senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan dengan cara penggunaan larutan 0,2% DPPH sebagai penampak bercak. Senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan menghasilkan warna bercak kuning dengan latar belakang ungu.

Selanjutnya untuk analisis kuantitatif dilakukan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH dengan spektrofotometri UV sinar tampak dan vitamin C sebagai pembanding. Diagram alir keseluruhan tahapan metode yang dilakukan tercantum pada **Gambar II.1**.



Gambar II.1 Skema Prosedur Penelitian