# BAB III

# METODE PENELITIAN

## Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium terpadu UMN – Alwashliyah. Rancangan penelitian ini meliputi pengumpulan sampel, pengolahan sampel, karakteristik simplisia, pembuatan ekstrak etanol daun senggani (*Melastoma candidum* D.Don) dengan menggunakan metode maserasi,skrining fitokimia, dilanjutkan dengan fraksinasi dengan N-Heksan dan Etil asetat, penetapan kadar flavonoid total dengan menggunakan Spektrofotometer visibel dan pengujian antioksidan ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun senggani (*Melastoma candidum* D.Don) dengan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serta ABTS (2,2-azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid).

### Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun senggani (*Melastoma candidum* D.Don) Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun senggani (*Melastoma candidum* D.Don) serta pengujian antioksidan ektrak etanol, fraksi n-heksan dan etil asetat daun senggani (*Melastoma candidum* D.Don) dengan metode DPPH dan ABTS.

### Parameter Penelitian

Parameter penelitian ini menggunakan uji spektrofotometer visibel, meliputi cara pembuatan kurva kaliberasi kuersetin dan preparasi sampel.

## Jadwal Dan Lokasi Penelitian

### Jadwal Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Januari – Juni 2024

### Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslin Nusantara Al-Washliyah Medan.

### Bahan

Bahan- bahan yang digunkan : Daun senggani, etanol 96%, N-Heksan, etil asetat, aquadest, raksa (II) klorida, bismut (II) nitrat, kaliumiodida, iodium, alfa naftol, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, toluene, klorofrom p, methanol, isopropanol, serbuk magnesium, amil alcohol,besi (III) klorida 1%, asam klorida 2 N, asam klorida pekat, timbal (II) asetat 0,4 M, kuersetin, vitamin C, larutan DPPH (1,1, difenil-2- pikrilhidrazil), kalium persulfat, larutan ABTS (2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

### Alat-alat

alat yang digunakan dalam penelitian yaitu blender, botol berwarna gelap, *rotary evaporator,* labu alas bulat, corong pisah, kapas, tisu, aluminium foil, timbangan analitik, pipet tetes, batang pengaduk, corong, gelas ukur, erlenmayer, beaker glass, tabung reaksi, labu ukur, cawan penguap, krus porselin, hot plate, dan seperangat alat spektrofotometer Visibel.

## Penyiapan Sampel

### Pengambilan Sampel

Sampel tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun senggani (*Melastoma candidum* D.Don) yang diperoleh dari kabupaten asahan, metode pengambilan sampel dengan metode purposive yaitu tanpa membandingkan tumbuhana serupa didaerah lain.

### Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan oleh Herbarium Medanense (MEDA) Universitas Sumatera Utara terhadap daun senggani yang akan diteliti.

### Pengolahan Sampel

Sampel daun senggani (*Melastoma candidum* D.Don) yang masih segar dikumpulkan disortasi basah untuk memisahkan cemaran (kotoran dan bahan asing lain) dari bahan simplisia dan ditimbang berat basahnya. Kemudian dikeringkan didalam lemari pengering hingga kering dan dilakukan sortasi kering yaitu membuag benda benda asing yang tertinggal pada simplisia. Kemudian ditimbang berat keringnya, haluskan dengan blender. Pembuatan serbuk halus bertujuan untuk memaksimalkan proses ekstraksi, semakin kecil ukuran serbuk semakin besar dan luas permukaannya sehingga interaksi sampel dan pelarut akan semkin efektif (Depkes RI 1985).

## Karakterisasi Simplisia

### Pemeriksaan Makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan pada tumbuhan segar daun senggani (*Melastoma candidum* D.Don) dengan cara memeriksa secara organoleptis yaitu dengan memperhatikan warna, bentuk, bau, dan ukuran. (Anggraeni, 2020).

### Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode Azeotropi (destilasi toluen). Alat terdiri dari alas bulat 500 mL, alat penampung, pendingin, tabung penyambung, dan tabung penerima 10 mL. Langkah pertama dilakukan penjenuhan toluen. Sebanyak 200 mL toluen dan 2 mL air suling dimasukkan ke dalam labu alas bulat, dipasang alat penampung dan pendingin kemudian didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama 30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 mL. Kemudian ke dalam labu tersebut dimasukkan 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama, labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, kemudian kecepatan destilasi dinaikkan sampai 4 tetes tiap detik. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluen. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar. Setelah air dan toluenmemisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0,05 mL. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen dengan rumus sebagai berikut (Anggraeni, 2020).

%Kadar air = $\frac{berat sampel (g) }{volume air (ml)}$ × 100%

### Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air

Penetapan kadar sari larut dalam air dilakukan dengan cara sebanyak 5 g serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dalam 100 mL air-kloroform (2,5 mL kloroform dalam air suling sampai 1 liter) dalam labu bersumbat sambil dikocok sesekali selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam, lalu disaring. Sejumlah 20 mL filtrat pertama diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang berdasar rata yang telah dipanaskan ditara. Sisa dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam air dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan dengan rumus sebagai berikut (Anggraeni, 2020).

%Kadar sari larut air= $\frac{berat sari (g)}{berat sampel (g)}$ × $\frac{100}{20}$ × 100%

### Pemeriksaan Kadara sari larut Dalam Etanol

Penetapan kadar sari yang larut dalam etanol dilakukan dengan cara sebanyak 5 g serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dalam 100 mL etanol 96% dalam labu bersumbat sambil dikocok sesekali selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol. Sejumlah 20 mL filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang berdasar rata yang telah dipanaskan dan ditara. Sisa dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam etanol dihitung dalam persen terhadap bahan yang dikeringkan di udara dengan rumus sebagai berikut (Anggraeni, 2020).

%Kadar sari larut etanol = $\frac{berat sari (g)}{berat sampel (g)}$ × $\frac{100}{20}$ × 100%

### Pemeriksaan Kadar Abu Total

Penetapan kadar abu total dilakukan dengan cara sebanyak 2 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama dimasukkan dalam krus porselin yang telah dipijar dan ditara, kemudian diratakan. Krus dipijar perlahan-lahan sampai arang habis, pijaran dilakukan pada suhu 600°C selama 3 jam kemudian didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung dalam persen terhadap bahan yang dikeringkan di udara dengan rumus sebagai berikut (Anggraeni, 2020).

%Kadar abu total = $\frac{berat abu (g) }{berat sampel (g)}$ × 100%

### Pemeriksaan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Penetapan kadar abu yang tidak larut dalam asam dilakukan dengan cara abu yang telah diperoleh dalam penetapan kadar abu total dididihkan dalam 25 mL asam klorida 2 N selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, kemudian dicuci dengan air panas. Residu dan kertas saring dipijarkan pada suhu 600°C sampai bobot tetap, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang dikeringkan dengan rumus sebagai berikut (Anggraeni, 2020).

%Kadar abu tidak larut asam = $\frac{berat abu (g) }{berat sampel (g)}$ × 100%

## Pembuatan Larutan Pereaksi

### Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,569 g raksa (II) klorida dilarutkan dalam air suling hingga 100 ml. pada wadah lain ditimbang sebanyak 5 g kalium iodide lalu dilarutkan dalam 10 ml air suling. Kedua larutan dicampurkan dan tambahkan air suling hingga diperoleh larutan 100 ml (Puspita Sari et al., 2019).

### Pereaksi Molish

Sebanyak 3 g α-naftol dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga 100 ml (Puspita Sari et al., 2019).

### Pereaksi Dragendorff

Sebanyak 0,8 g bismut (III) nitrat dilarutkan dalam asam nitrat pekat 20 ml kemudian dicampurkan dengan kalium iodide sebanyak 27,2 g dalam 50 ml air suling. Campuran didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan diencerkan dengan air secukupnya hingga 100 ml (Puspita Sari et al., 2019).

### Pereaksi Bouchardat

Sebanyak 4 g kalium iodide dilarutkan dalam air suling secukupnya kemudian ditambahkan 2 g iodium sedikit demi sedikit cukupkan dengan air suling hingga 100 (Puspita Sari et al., 2019).

### Pereaksi Liebermann-Burchard

Sebanyak 5 bagian volume asam sulfat pekat dicampurkan dengan 50 bagian volume etanol 95%, lalu ditambahkan dengan hati-hati 5 bagian volume asam asetat anhidrida ke dalam campuran tersebut dan didinginkan (Puspita Sari et al., 2019).

### Pereaksi Besi (III) klorida 1%

Sebanyak 1 g besi (III) klorida dilarutkan dalam air suling sampai 100 ml (Puspita Sari et al., 2019).

### Pereaksi asam klorida 2N

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat diencerkan dengan air suling sampai 100 ml (Puspita Sari et al., 2019).

### Pereaksi Timbal (II) asetat 0,4 M

Sebanyak 15,17 g timbal (II) asetat dilarutkan dalam air suling bebas CO2 hingga 100 ml (Puspita Sari et al., 2019).

### Pereaksi Asam Sul fat 2N

Sebanyak 5,5 ml asam sulfat pekat diencerkan dengan air suling sehingga diperoleh 100 ml (Puspita Sari et al., 2019).

### Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Senggani

Ektrak etanol Daun Senggani (*Melastoma candidum* D.Don)dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam bejana, dituangi dengan pelarut etanol 96 % sebanyak 75 bagian atau 3750 ml, didiamkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk, lalu di peras sehingga diperoleh maserat I. Kemudian ampas yang diperoleh dibilas dengan 25 bagian etanol 96 % sebanyak 1250 ml dan didiamkan selama 2 hari, lalu disaring sehingga diperoleh maserat II. Kemudian dicampurkan maserat I dan maserat II dan dienap tuangkan selama 2 hari, lalu dipekatkan dengan cara diuapkan pada rotary evaporator dengan suhu tidak lebih dari 50 ºC hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1979).

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

## Pembuatan Fraksi

Ektarak etanol difraksinasikan beturut - turut dengan pelarut N-Heksan dan etil Asetat. Sebanyak 20 gram ekstrak etanol dilarutkan dalam 100 ml etanol 96% dan ditambahkan 100 ml aquadest lalu dimasukan kedalam corong pisah, kemudian ditambahkan larutan N-Heksan 200 ml, digojok dan didiamkan hingga terpisah sempurna. Fase N-Heksan akan berada pada bagian atas dan fase etanol-air berada pada bagian bawah , kemudian dipisahkan. Fase etanol-airnya diekstraksii lagi dengan N-Heksan sebanyak beberapa kali. Fase etanol-air kemudian ditambahkan etil asetat 200 ml, digojok dan didiamkan hingga terpisah sempurna. Fase etil asetat akan berada pada bagian atas dan fase dan fase etanol-air berada pada bangian bawah, kemudian dipisahkan. Fase etanol-airnya di ekstraksi sebanyak beberapa kali. Kemudian larutan N-Heksan dan larutan etil asetat yang dihasilkan masing-masing dipekatkan hingga didapat fraksi N-Heksan dan fraksi etil asetat. (Sugiarti et al., 2020)

## Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia daun senggani (*Melastoma candidum* D.Don*.)* meliputi pemeriksaan senyawa alkaloid, flavonoid, sapponin, tanin, triterpenoid/steroid dan glikosida.

### Pemeriksaan Alkaloid

Sampel uji ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh dipakai untuk uji alkaloida, diambil 3 tabung reaksi, lalu kedalamnya dimasukkan 0,5 ml filtrat.

Masing-masing tabung reaksi ditambahkan pereaksi yang berbeda.

* Tabung reaksi 1: ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer
* Tabung reaksi 2: ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat
* Tabung reaksi 3: ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff

Alkaloid positif jika terjadi endapan atau kekeruhan pada paling sedikit dua dari tiga percobaan diatas (Puspita Sari et al., 2019).

### Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 10 g sampel uji ditambahkan 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, kedalam 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoida positif jika terjadi warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Puspita Sari et al., 2019).

### Pemeriksaan Saponin

Sampel uji ditimbang sebanyak 0,5 g dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air panas, dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil dan tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2N menunjukkan adanya saponin (Puspita Sari et al., 2019).

### Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 1 ml sampel kedalam tabung reaksi kemudian ditambah FeCl3, terbentuknya warna merah menandakan tannin merupakan golongan senyawa fenol. Ekstrak daun senggani sebanyak 1 ml dilarutkan dengan sedikit aquades lalu dipanaskan di atas penangas air kemudian ditetesi dengan larutan gelatin 1% (1:1). Hasil positif tadanya endapan putih (Pangondian Harahap et al., 2022).

### Pemeriksaan Triterpenoid dan Steroid

Sebanyak 1 ml ekstrak daun senggani dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 ml kloroform kemudian ditambah 0,5 mL asam cuka anhidrat. Kemudian ditambahkan 1-2 mL H2SO4 (P) melewati dinding tabung. Hasil yang diperoleh berupa cincin coklatan atau berwarna violet menunjukkan adanya triterpen, Jika terbentuk warna hijau kebiruan adanya steroid (Pangondian Harahap et al., 2022).

### Pemeriksaan Glikosida

dilakukan dengan cara serbuk simplisia ditimbang sebanyak 3 g, lalu disari dengan 30 mL campuran etanol 96% dengan air (7:3) dan 10 mL asam klorida 2 N, direfluks selama 2 jam, didinginkan dan disaring. Diambil 20 mL filtrat ditambahkan 25 mL air suling dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok, didiamkan 5 menit lalu disaring. Filtrat disari dengan 20 mL campuran isopropanol dan kloroform (2:3), dilakukan berulang sebanyak 3 kali. Sari air dikumpulkan dan diuapkan pada temperatur tidak lebih dari 50٥C. Sisanya dilarutkan dalam 2 mL metanol. Larutan sisa digunakan untuk percobaan berikut: 0,1 mL larutan percobaan dimasukan dalam tabung reaksi dan diuapkan di atas penangas air. Pada sisa ditambahkan 2 mL air dan 5 tetes pereaksi Molish. Kemudian secara perlahan-lahan ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung, terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas kedua cairan menunjukkan ikatan gula(Anggraeni, 2020)

## Penetapan Kadar Flavonoid Total

### Pembuatan Larutan Kuersetin

Ditimbang 25 mg kuersetin, dilarutkan dalam labu terukur 25 ml ditambah etanol sampai tanda batas kedalam larutan Induk Baku (C= 1000 µg/ml) LIB I. Lalu dipipet 2,5 ml dari LIB I dimasukan kedalam labu terukur 25 ml dicukupkan dengan etanol sampai tanda batas (C= 100 µg/ml) LIB II. (Yeti & Yuniarti, 2021)

### Pembuatan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Dipipet 0,6 ml dari larutan induk baku II (LIB II) masukan kedalam labu terukur 10 ml, lalu ditambahkan 0,1 ml AlCl3 10%, 0,1 ml natrium asetat 1 M, dan tambahkan 2,8 ml aquadest, lalu ditambahkan etanol sampai tanda batas, dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 431 nm. (Yeti & Yuniarti, 2021)

### Pembuatan Operating Time

Dipipet 0,6 ml dari larutan induk baku II (LIB II) masukan kedalam labu terukur 10 ml, ditambah 0,1 ml AlCl3 10%, 0,1 ml natrium asetat 1 M, dan tambahkan 2,8 ml aquadest, lalu ditambahkan etanol sampai tanda batas, lalu diukur operating time kuersetin selama 60 menit pada panjang gelombang 431 nm. (Yeti & Yuniarti, 2021)

### Pengukuran Kurva Kalibrasi Kuersetin

Dipipet dari LIB II masing-masing 0,3 ml, 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, dan 1 ml kedalam labu 10 ml dengan konsentrasi 3 µg/ml, 4 µg/ml, 6 g/ml, 8 µg/ml dan 10 µg/ml lalu ditambahkan 1,5 ml etanol, 0,1 ml aluminium klorida 10%, 0,1 ml natrium asetat 1M, dan ditambahkan 2,8 ml aquadest, ditambahkan etanol sampai tanda batas, dihomogenkan dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 431 nm(Yeti & Yuniarti, 2021)

###  Penetapan Kadar Flavonoid Total dari Ekstrak Etanol Daun Senggani *(Melastoma candidum* D.Don*.)*

Ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat dari daun senggani *(Melastoma candidum* D.Don*.)* diukur sebanyak 25 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml. Kemudian, larutan tersebut ditambahkan etanol hingga mencapai tanda batas dengan konsentrasi (C = 1000 µg/ml).

Selanjutnya, diambil 1 ml dari larutan tersebut dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml. Ditambahkan 1,5 ml etanol, 0,1 ml aluminium klorida 10%, 0,1 ml natrium asetat 1M, dan ditambahkan 2,8 ml aquadest. Selanjutnya, dicukupkan dengan etanol hingga mencapai tanda batas, dilakukan 6 kali pengulangan. (Elma Natasya, et al, 2016)

### Analisa Data

Kandungan flavonoid yang diperoleh akan diuji terlebih dahulu melalui analisis data menggunakan regresi linear yang ditentukan oleh persamaan y = bx + a, yang dibangun berdasarkan data absorbansi dan konsentrasi dari larutan standar. Setelahnya, total senyawa flavonoid dihitung menggunakan rumus (Elma Natasya, et al, 2016)

F$=\frac{c ×V ×f}{m} ×100\% =$

Keterangan:

F : Jumlah Flavonoid

c : Kesetaraan Kuersetin

V : Volume total ekstrak

m : Berat Sampel (g)

## Pengujian Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH Daun Senggani

### Prinsip Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

Kemampuan sampel uji dalam perendam proses oksidasi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) sebagai radikal bebes dalam larutan methanol (sehingga terjadi perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning) dengan nilai IC50 (konsentrasi sampel uji yang mampu merendam radikal bebas 50%) digunakan sebagai parameter untuk menentukan aktifitas antioksidan sampel uji tersebut.(Molyneux, 2004)

### Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH disiapkan dengan cara menimbang 25 mg DPPH dan dilarutkan dengan metanol, kemudian dimasukan kedalam labu takar 25 ml, volume akhir dicukupkan sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan, sehingga diperoleh larutan stok DPPH dengan konsentrasi 1000 μg/ml (LIB I). Kemudian di pipet 5 ml kedalam labu 25 ml kemudian dicukupkan dengan metanol konsentrasi 200 μg/ml ( LIB II) (Pangondian Harahap et al., 2022)

### Penetapan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH konsentrasi 200 μg/ml, dipipet sebanyak 2 ml dan dimasukan kedalam labu tentukur 10 ml, dicukupkan dengan metanol sampai tanda batas, diperoleh larutan DPPH konsentrasi 40 μg/ml, diukur absorbansinya pada panjanag gelombang 515 nm, sehingga diperoleh absorbansi maksimum sebagai panjang gelombang maksimim DPPH.

### Pengukuran *operating time* DPPH

Sebanyak 2 ml larutan DPPH LIB II dimasukan dalam labu tentukur 10 ml, dicukupkan volumenya dengan metanol hingga tanda batas, dimasukan kedalam alat spektrofotometer untuk mengukur *operating time* dimulai dari menit pertama hingga diperoleh absorbansi stabil, sebagai *operating time* (waktu kerja pengukuran yang baik).

### Pembuatan Larutan Sampel Daun Senggani (*Melastoma candidum* D.Don.)

Disiapkan dan ditimbang ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan dan fraksi etil asetat daun senggani masing-masing sebanyak 25 mg, kemudian dimasukan kedalam labu tentukur 25 ml dilarutkan dengan methanol lalu volumenya dickupkan dengan methanol sampai garis tanda batas (konsentrasi 1000 μg/ml). Kemudian di pipet 5 ml kedalam labu 25 ml kemudian dicukupkan dengan metanol konsentrasi 200 μg/ml ( LIB II)

### Pengukuran Absorbansi campuran DPPH dan Daun Senggani (*Melastoma candidum* D.Don)

Dipipet larutan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat (dari konsentrasi 200 μg/ml) masing-masing sebanyak 0,3 mL; 0,4 mL; 0,5 mL; 0,6 mL; 0,7 mL,masing-masing dimasukan kedalam labu tentukur 10 ml, dan masing-masing ditambah dengan 1 ml larutan DPPH (dari larutan konsentrasi 200 μg/ml), lalu volumenya dicukupkan dengan methanol sampai garis tanda batas, maka diperoleh larutan konsentrasi 6 ppm; 8 ppm; 10 ppm; 12 ppm; dan 14 ppm. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (515 nm). (Pangondian Harahap et al., 2022)

Dipipet larutan fraksi *n-*heksan (dari konsentrasi 200 μg/ml) masing-masing sebanyak 0,5 mL; 0,6 mL; 0,7 mL; 0,8 mL; 0,9 mL,masing-masing dimasukan kedalam labu tentukur 10 ml, dan masing-masing ditambah dengan 1 ml larutan DPPH (dari larutan konsentrasi 200 μg/ml), lalu volumenya dicukupkan dengan methanol sampai garis tanda batas, maka diperoleh larutan konsentrasi 10 ppm; 12 ppm; 14 ppm; 16 ppm; dan 18 ppm. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (515 nm)

### Pembuatan Larutan Vitamin C

Vitamin C disiapkan dengan cara menimbang 50 mg vitamin C dan dilarutkan dengan aquadest, kemudian dimasukan kedalam labu takar 50 ml, volume akhir dicukupkan sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan, sehingga diperoleh larutan stok vitamin C dengan konsentrasi 1000 μg/ml. kemudian dipipet 10 ml dari konsentrasi 1000 μg/ml kedalam labu 50 ml volume akhir dicukupkan sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan, sehingga diperoleh larutan stok vitamin C dengan konsentrasi 200 μg/ml.

### Pengukuran Absorbansi Campuran DPPH dan Vitamin C

Selanjutnya larutan 200 μg/ml. digunakan untuk pengukuran absorbansi dipipet masing-masing sebanyak 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; 0,5 mL diencerkan dengan aquadest dalam labu tentukur sampai 5 ml lalu di tambahkan 1 ml larutan DPPH (konsentrasi 200 μg/ml), sehingga diperoleh larutan vitamin C konsentasi 1ppm; 2 ppm; 3 ppm; 4 ppm dan 5 ppm. diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (515 nm). (Pangondian Harahap et al., 2022)

## Analisa Data

### Penentian Persen Peredaman (% inhibisi)

Kemampuan antioksidan diperhingkan dari angka penurunan serapann larutan DPPH (penurunan/Peredaman warna ungu DPPH) akibat adanya penambahan larutan ekstrak fraksi sebagai bahan ujii larutana vitamin C sebagaii bahan pembanding. Perbedaan nilaii nilai serapan larutan DPPH sebelum dan sesudah penambahan larutan uji tersebutt dihitung sebagi persen inhibisi.

% inhibisi=$\frac{absorbansi DPPH (sebelum ditambah ekstrakk -sesudah ditambah ekstrak)}{absorbansi DPPH sebelum ditambah sampel}100\%$

### Penentian Nilai IC50

 Nilai IC50 merupakan bilangan yang menunjukan konsentrasi sampel uji (μg/ml) yang memberikan perendman DPPH sebesar 50% (mampu menghambat atau merendam prose oksidasi sebesar 50%). Nilaia 0% bererti tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100% bererti Peredaman total dengan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya. Hasil perhitungan dimasukan kedalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak (μg/ml) sebagi absis (sumbu X) dan nilai % Peredaman (antioksidan) sebagai ordinat (y). kemudian dari persamaan tersebutt, dihitung nilai IC50 untuk mendapatkan nilai antioksidannya.

 y = a*x* $\pm $b

keterangan: y = % inhibisi

 a = intersep

 b = koefisien regresi

 x = konsentrasi uji

## Pengujian Aktivitas Antioksidan Dengan Metode ABTS Daun Senggani

### Pembuatan Larutan Stok ABTS

1. Larutan a : Ditimbang 18 mg ABTS, dilarutkan dalam 5 ml aquadest. Diinkubasi selama 12 jam
2. Larutan b : Ditimbang 3,3 mg K2S2O8, dilarutkan dalam 5 ml aquadest. Diinkubasi selama 12 jam
3. Larutan a dan b dicampur dalam ruang gelap dan cukupkan volumenya de ngan etanol absolut sampai 25 ml diperoleh konsentrasi 852 μg/ml (LIB I) (Sami & Rahimah, 2016).

Kemudian dipipet 5,8 ml kedalam labu 25 ml kemudian dicukupkan dengan methanol konsentrasi 200 μg/ml (LIB II).

### Penetapan Panjang Gelombang Maksimum ABTS

Larutan ABTS dipipet sebanyak 1 ml dan dicukupkan volumenya sampai 5 ml dengan etanol absolut dalam labu terukur. Larutan ini kemudian diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. (Sami & Rahimah, 2016)

### Pengukuran *operating time* ABTS

Sebanyak 1 ml larutan ABTS dimasukan dalam labu tentukur 5 ml, dicukupkan volumenya dengan etanol hingga tanda batas. Lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang maksimum diperoleh, dimulai dari menit pertama hingga diperoleh absorbansi stabil, sebagai *operating time* (waktu kerja pengukuran yang baik).(Erma Novita Sari et al., 2022)

### Pembuatan Larutan Sampel Daun Senggani (*Melastoma candidum D.Don.)*

Disiapkan dan ditimbang ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan dan fraksi etil asetat daun senggani masing-masing sebanyak 25 mg, kemudian dimasukan kedalam labu tentukur 25 ml dilarutkan dengan etanol lalu volumenya dicukupkan dengan etanol sampai garis tanda batas LIB I. Kemudian di pipet 5 ml kedalam labu 25 ml kemudian dicukupkan dengan etanol konsentrasii 200 μg/ml ( LIB II). (Sami & Rahimah, 2016)

### Pengukuran Absorbansi campuran ABTS dan Daun Senggani (*Melastoma candidum D.Don*.)

Dipipet larutan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat masing-masing sebanyak 0,15 ml; 0,2 ml; 0,25 ml; 0,3 ml dan 0,35 ml masing-masing dimasukan kedalam labu tentukur 5 ml, dan masing-masing ditambah dengan 1 ml larutan ABTS, lalu volumenya dicukupkan dengan etanol sampai garis tanda batas, maka diperoleh larutan konsentrasi 6 ppm; 8 ppm; 10 ppm; 12 ppm dan 14 ppm Selanjutnya didiamkan selama 6 menit dan ukur absorbansinya dengan panjang gelombang 750 nm.

Dipipet larutan fraksi N-Heksan masing-masing sebanyak 0,2 ml; 0,25 ml; 0,3 ml; 0,35 ml dan 0,4 ml masing-masing dimasukan kedalam labu tentukur 5 ml, dan masing-masing ditambah dengan 1 ml larutan ABTS, lalu volumenya dicukupkan dengan etanol sampai garis tanda batas, maka diperoleh larutan konsentrasi 8 ppm; 10 ppm; 12 ppm; 14 ppm dan 16 ppm. Selanjutnya didiamkan selama 6 menit dan ukur absorbansinya dengan panjang gelombang 750 nm. (Sami & Rahimah, 2016)

### Pembuatan Larutan Vitamin C

Vitamin C disiapkan dengan cara menimbang 50 mg vitamin C dan dilarutkan dengan aquadest, kemudian dimasukan kedalam labu takar 50 ml, volume akhir dicukupkan sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan, sehingga diperoleh larutan stok vitamin C dengan konsentrasi 1000 μg/ml. kemudian dipipet 10 ml dari konsentrasi 1000 μg/ml kedalam lab u 50 ml volume akhir dicukupkan sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan, sehingga diperoleh larutan stok vitamin C dengan konsentrasi 200 μg/ml.

### Pengukuran Absorbansi Campuran ABTS dan Vitamin C

Selanjutnya larutan 200 μg/ml. digunakan untuk pengukuran absorbansi dipipet masing-masing sebanyak 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; 0,5 mL diencerkan dengan aquadest dalam labu tentukur sampai 5 ml lalu di tambahkan 1 ml larutan DPPH (konsentrasi 200 μg/ml), sehingga diperoleh larutan vitamin C konsentasi 1ppm; 2 ppm; 3 ppm; 4 ppm dan 5 ppm. diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Pangondian Harahap et al., 2022)

## Analisa Data

### Penentian Persen Peredaman (% inhibisi)

Kemampuan antioksidan diperhingkan dari angka penurunan serapan larutan ABTS akibat adanya penambahan larutan ekstrak fraksi sebagai bahan uji larutana vitamin C sebagaii bahan pembanding. Perbedaan nilai-nilai serapan larutan ABTS sebelum dan sesudah penambahan larutan uji tersebut dihitung sebagi persen inhibisi.

%inhibisi=$\frac{absorbansi DPPH (sebelum ditambah ekstrakk -sesudah ditambah ekstrak)}{absorbansi DPPH sebelum ditambah sampel}×100\%$

### Penentian Nilai IC50

 Nilai IC50 merupakan bilangan yang menunjukan konsentrasi sampel uji (μg/ml) yang memberikan Peredaman ABTS sebesar 50% (mampu menghambat atau merendam prose oksidasi sebesar 50%). Nilai 0% bererti tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti Peredaman total dengan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya. Hasil perhitungan dimasukan kedalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak (μg/ml) sebagi absis (sumbu X) dan nilai % Peredaman (antioksidan) sebagai ordinat (y). kemudian dari persamaan tersebutt, dihitung nilai IC50 untuk mendapatkan nilai antioksidannya.

 y = a*x* $\pm $b

keterangan: y = % inhibisi

 a = intersep

 b = koefisien regresi

 x = konsentrasi uji