

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat pengujian sampel dilakukan di Laboratorium Kimia dan Toksikologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar, dan Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Warmadewa, serta Laboratorium Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat Dinas Kesehatan Provinsi Bali.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai dengan Maret 2025.

D. Sampel Penelitian

1. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah hasil skrining fitokimia dan aktifitas antioksidan nano ekstrak etanol 96% daun cemcem (*Spondias pinnata (L.f.) Kurz*), yang dinyatakan dengan IC_{50} .

2. Sampel

Sampel dari penelitian ini adalah nano ekstrak etanol 96% daun cemcem yang diperoleh dari ekstrak daun cemcem (*Spondias pinnata (L.f.) Kurz*) yang telah di maserasi dan di evaporasi, kemudian dilanjutkan dengan sintesis nano ekstrak dengan metode gelasi ionik.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Data yang dikumpulkan berupa data primer dan data sekunder. Untuk memperoleh data primer dilakukan pengujian skrining fitokimia dan uji aktivitas

antioksidan nano ekstrak etanol 96%. Sedangkan data sekunder diperoleh dari berbagai referensi yang membahas tentang pengujian skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan nano ekstrak etanol 96%, yang diambil dari literatur terkait.

2. Cara pengumpulan data

Pada penelitian ini dilakukan melalui percobaan laboratorium dengan menganalisis kandungan fitokimia sampel nano ekstrak daun cemcem etanol 96% secara kualitatif dan menganalisis aktivitas antioksidan ekstrak daun cemcem etanol 96% secara kuantitatif.

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen - instrumen yang digunakan dalam pengumpulan data dalam penelitian ini adalah alat tulis dan kamera.

4. Alat dan bahan

a. Alat

Alat-alat yang diperlukan pada penelitian ini adalah pipet volume 1 mL, 2 mL, 5 mL (*Pyrex*), pipet ukur (*Pyrex*) 50 mL, pipet tetes, bulb pipet (*D&N ball pipet*), batang pengaduk, spatula, ayakan 40 mesh, nampan, Aluminium foil, beaker gelas (*Iwaki*) 250 ml, Erlenmayer (*Iwaki*) 250 ml, gelas ukur (*Iwaki*) 50 ml, tabung reaksi (*Iwaki*), rak tabung reaksi labu takar (*Iwaki*), vortex mixer, termometer air raksa, blender (*Philip*), hot plate (*Jisico*), neraca analitik (*Ohaus*), oven (*Memmert Germany*) kuvet dan spektrofotometer UV-Vis (*Analytik Jena*).

b. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cemcem (*Spondias pinnata (L.f.) Kurz*), etanol 96%, air panas, kertas label, tissue, aluminium

foil, kitosan (*Sigma Aldrich*), Na-TPP (*Xilong-Scientific*), Fe (III) klorida 1% (*Merck*), gelatin 1%, serbuk magnesium, asam sulfat pekat (H_2SO_4), reagen dragendorf, reagen mayer, reagen wagner, asam klorida (HCl) (*Merck*), methanol , padatan DPPH (*Aldrich*), NaOH 2% (*Merck*), Iodin (*Polylab*), $FeCl_3$, dan NaCl 10%.

5. Prosedur penelitian

Pada penelitian ini prosedur penelitian yang dilakukan yaitu:

a. Ekstraksi

Prosedur ekstraksi pada penelitian ini mengacu pada Becti, Dharmawati, dan Habibah 2022 dengan modifikasi.

1) Pre-analitik

a) Pengambilan daun cemcem

Pengambilan sampel daun cemcem diperoleh dari tumbuhan cemcem yang diambil disekitaran Desa Sukawati dan Kabupaten Buleleng, Sampel daun cemcem yang digunakan adalah daun yang memenuhi kriteria tertentu sesuai dengan standar penelitian.

b) Pembuatan serbuk simplisia

(1) Mengumpulkan daun cemcem.

(2) Melakukan pencucian daun cemcem menggunakan air mengalir, kemudian menyeleksi daun sesuai dengan kriteria sampel yang telah ditentukan.

(3) Kemudian melayukan daun dengan cara diangin-anginkan secara alami, tanpa terkena paparan langsung sinar matahari.

(4) Lalu mengeringkan daun cemcem dengan oven suhu 50°C, hingga kering.

(5) Menghaluskan daun cemcem yang telah kering dengan cara diblender.

(6) Mengayak serbuk sampai diperoleh bubuk halus menggunakan ayakan.

c) Pengujian kadar air

Prosedur uji kadar air pada penelitian ini mengacu pada Tuapattinaya, Simal dan Warella, 2021 dengan modifikasi.

- (1) Cawan porselin dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam, kemudian didinginkan dalam desikator selama 1 jam. Setelah itu, cawan ditimbang menggunakan neraca analitik.
- (2) Kemudian, sebanyak 100 g sampel dimasukkan ke dalam cawan.
- (3) Cawan yang berisi sampel kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam. Setelah itu, cawan dipindahkan ke dalam desikator selama 1 jam, kemudian bobot cawan beserta sampel ditimbang.
- (4) Pengeringan dilakukan berulang kali sampai bobot sampel mencapai berat yang konstan. Analisis dilakukan dengan 3 kali pengulangan untuk setiap sampel.

2) Analitik

a) Prosedur maserasi

- (1) Setelah mendapatkan bubuk halus, dimasukkan bubuk simplisia ke dalam wadah maserasi sebanyak 400 g (botol kaca atau wadah dengan penutup rapat).
- (2) Menambahkan etanol 96% sebanyak 2 liter. Rasio yang digunakan adalah 1:5 (1 bagian simplisia : 5 bagian pelarut).
- (3) Menutup wadah dengan rapat dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang.
- (4) Mengaduk wadah secara berkala untuk memastikan pelarut bercampur merata dengan simplisia.
- (5) Didiamkan maserasi berlangsung selama 3 hari.
- (6) Melakukan pengulangan perendaman hingga 2 kali.

b) Prosedur penyaringan

- (1) Menyaring larutan menggunakan kertas saring.
- (2) Memisahkan antara ekstrak cair (filtrat) dengan ampas simplisia.

c) Proses evaporasi

- (1) Dipekatkan ekstrak cair daun cemcem dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C hingga didapat ekstrak kental.
- (2) Setelah diperoleh, disimpan pada wadah yang bersih dan tertutup rapat.

3) Pasca analitik

- a) Menimbang ekstrak pekat yang diperoleh.
- b) Mencatat hasil serta perhitungan rendemen.
- c) Membersihkan semua alat dan bahan yang telah dipakai.
- d. Mengelola limbah dengan menyimpan sisa pelarut pada kontainer limbah cair.

b. Nano Ekstrak

Proses sintesis nano ekstrak pada penelitian ini mengacu pada Ramadhani dkk, 2021.

1) Pre analitik

- a) Proses pembuatan polimer kitosan konsentrasi 0,2%
 - (1) Menimbang bubuk kitosan pada neraca analitik sebanyak 0,2 g.
 - (2) Melarutkan bubuk kitosan sebanyak 0,2 g dalam 100 mL asam asetat glacial.
- b) Proses pembuatan larutan Na-TPP konsentrasi 0,1%
 - (1) Menimbang bubuk Na-TPP pada neraca analitik sebanyak 0,1 g.
 - (2) Melarutkan bubuk Na-TPP sebanyak 0,1 g dalam 100 mL akuades.

2) Analitik

- a) Menimbang sebanyak 1 g ekstrak kental daun cemcem.
- b) Menambahkan larutan etanol p.a sebanyak 35 mL.
- c) Menambahkan akuades sebanyak 15 mL.
- d) Menambahkan kitosan ditambahkan sebanyak 50 mL 0,2 %
- e) Menambahkan secara bertahap dengan Na-TPP 0,1% sebanyak 10 mL sambil diaduk dengan magnetic stirrer kecepatan 400 rpm selama 20 menit.
- f) Dicentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.
- g) Mengukur transmitansi larutan nano ekstrak secara spektrofotometri di panjang gelombang 650 nm.

3) Pasca analitik

- a) Mencatat hasil % transmittan yang diperoleh.
- b) Menganalisis hasil.
- c) Membersihkan semua alat dan bahan yang telah dipakai.
- d) Mengelola limbah dengan menyimpan sisa pelarut pada kontainer limbah cair.

c. Skrining Fitokimia

Prosedur skrining fitokimia pada penelitian ini mengacu pada Minocha dkk, 2015; Shaikh dan Patil 2020 dengan modifikasi.

1) Pre analitik

Flavonoid

- a) Menyiapkan terlebih dahulu alat yang akan digunakan seperti, pipet tetes, spatula, dan neraca analitik, dan 1 buah tabung reaksi.
- b) Menyiapkan bahan yang akan diperlkan seperti pereaksi Mg, HCl 10%, dan sampel nano ekstrak etanol 96% daun cemcem.

Fenol

- a) Menyiapkan terlebih dahulu alat yang digunakan seperti, pipet tete, spatula, neraca analitik, beaker glass, dan 1 buah tabung reaksi.
- b) Menyiapkan bahan yang akan diperlukan seperti reagen $FeCl_3$ dan sampel nano ekstrak etanol 96% daun cemcem.

Alkaloid

- a) Menyiapkan terlebih dahulu alat yang digunakan seperti, pipet tete, spatula, neraca analitik, beaker glass, dan 2 buah tabung reaksi.
- b) Menyiapkan bahan yang akan diperlukan seperti Reagen mayer, reagen wagner, dan sampel nano ekstrak etanol 96% daun cemcem.

Tanin

- a) Menyiapkan terlebih dahulu alat yang akan digunakan seperti, pipet tetes, spatula, neraca analitik, beaker glass, dan 1 buah tabung reaksi.
- b) Menyiapkan bahan yang akan diperlkan seperti reagen timbal asetat dan sampel nano ekstrak etanol 96% daun cemcem.

Saponin

- a) Menyiapkan terlebih dahulu alat yang akan digunakan seperti, pipet tetes, spatula, dan neraca analitik, beaker glass dan 1 buah tabung reaksi.
- b) Menyiapkan bahan yang akan diperlkan seperti akuades, air, dan sampel nano ekstrak etanol 96% daun cemcem.

2) Analitik

Flavonoid

- a) Ke dalam tabung reaksi pada uji flavonoid dimasukkan 1 mL sampel nano ekstrak etanol 96% daun cemcem, 2 mL Mg dan HCl encer
- b) Dikocok dan mengamati perubahan yang terjadi.

Fenol

- a) Ke dalam tabung reaksi pada uji fenol dipipet 1 mL sampel nano ekstrak etanol 96% daun cemcem, kemudian ditambahkan 3-5 tetes $FeCl_3$.
- b) Dikocok dan mengamati perubahan yang terjadi.

Alkaloid

- a) Ke dalam tabung reaksi pada uji mayer dipipet 1 mL sampel nano ekstrak etanol 96% daun cemcem, kemudian dimasukkan 1-2 tetes reagen mayer.
- b) Dikocok dan mengamati perubahan yang terjadi.
- c) Ke dalam tabung reaksi pada uji wagner dipipet 1 mL sampel nano ekstrak etanol 96% daun cemcem, kemudian dimasukkan 1-2 tetes reagen wagner.
- d) Dikocok dan mengamati perubahan yang terjadi.

Tanin

- a) Ke dalam tabung 1 pada uji Tanin dimasukkan sebanyak 1 mL nano ekstrak etanol 96% daun cemcem, dan 1 mL reagen timbal asetat.
- b) Dikocok dan mengamati perubahan yang terjadi.

Saponin

- a) Ke dalam tabung reaksi dimasukkan sebanyak 1 mL nano ekstrak etanol 96% daun cemcem, kemudian encerkan dengan akuades sebanyak 20 mL.
- b) Di kocok dengan vortex mixer selama 15 menit
- c) Lalu ditambahkan 0,5 gram dengan 2 ml air.
- d) Dikocok dan mengamati perubahan yang terjadi.

3) Pasca analitik

Flavonoid

- a) Mencatat hasil, pada uji flavonoid, jika positif (+) akan terjadi perubahan warna menjadi orange.
- b) Membersihkan alat dan bahan yang telah digunakan.
- c) Mengelola limbah dengan menyimpan sisa pelarut pada kontainer limbah cair.

Fenol

- a) Mencatat hasil, pada uji fenol jika positif (+) akan terjadi perubahan warna menjadi biru kehitaman.
- b) Membersihkan alat dan bahan yang telah digunakan.
- c) Mengelola limbah dengan menyimpan sisa pelarut pada kontainer limbah cair.

Alkaloid

- a) Mencatat hasil pada uji mayer positif (+) jika endapan putih-kuning, pada uji wagner positif (+) jika terbentuk endapan coklat-kemerahan.
- b) Membersihkan alat dan bahan yang telah digunakan.
- c) Mengelola limbah dengan menyimpan sisa pelarut pada kontainer limbah cair.

Tanin

- a) Mencatat hasil, pada uji tannin, positif (+) jika terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman.
- b) Membersihkan alat dan bahan yang telah digunakan.
- c) Mengelola limbah dengan menyimpan sisa pelarut pada kontainer limbah cair.

Saponin

- a) Mencatat hasil, pada uji saponin, positif (+) jika terjadi pembentukan lapisan busa setinggi 1 cm dan busa yang stabil selama 10 menit.

- b) Membersihkan alat dan bahan yang telah digunakan.
- c) Mengelola limbah dengan menyimpan sisa pelarut pada kontainer limbah cair.

d. Aktivitas Antioksidan

Proses aktivitas antioksidan dalam penelitian ini mengacu pada Habibah *dkk.*, 2023 dengan modifikasi.

1) Pre analitik

a) Proses pembuatan larutan induk sampel

- (1) Larutan uji dibuat dalam berbagai konsentrasi dengan menggunakan larutan induk nano ekstrak daun cemcem sebesar 500 ppm.
- (2) Sampel nano ekstrak daun cemcem sebanyak 0,5 mL dipipet dan dilarutkan ke dalam 10 mL etanol menggunakan labu ukur 10 mL.
- (3) Melakukan pengenceran menggunakan methanol dengan membuat variasi konsentrasi yaitu:

Tabel 2 Seri Konsentrasi Sampel		
Konsentrasi (ppm)	Volume Larutan Induk Sampel 500 ppm (mL)	Volume Akhir
30	0,6	10
60	1,2	10
90	1,8	10
120	2,4	10
150	3	10

b) Pembuatan larutan stock DPPH 0,1 mM

- (1) Menimbang sebanyak 3,94 mg padatan DPPH.
- (2) Untuk memperoleh konsentrasi DPPH 0,1 mM, dilarutkan dengan 100 mL methanol.

c) Penentuan Serapan Larutan Blanko DPPH

- (1) Memipet sebanyak 2 mL larutan DPPH 0,1 mM
- (2) Kemudian tambahkan metanol 2 mL ke dalam kuvet.
- (3) Lalu di Spektrofotometri UV- Vis pada panjang gelombang (λ) 516 nm.

2) Analitik

a) Proses penentuan aktivitas antioksidan sampel nano ekstrak daun cemcem terhadap DPPH

- (1) Dipipet larutan seri masing – masing formulasi sampel 30, 60, 90, 120, dan 150 ppm, sebanyak 2 mL setiap seri pada tabung reaksi
- (2) Kemudian ditambahkan larutan DPPH sebanyak 2 mL.
- (3) Setiap sampel dibuat secara triplo
- (4) Lalu ditaruh pada ruangan gelap selama 30 menit, sampai terjadi perubahan warna dari aktivitas DPPH.
- (5) Mengukur serapan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang (λ) 516 nm.

3) Pasca analitik

- a) Menghitung % inhibisi seri konsentrasi sampel
- b) Membuat persamaan regresi linier antara seri konsentrasi sampel (ppm) dan menentukan nilai IC_{50} .
- c) Melakukan interpretasi nilai IC_{50}
- d) Melakukan penanganan limbah.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

a. Pengolahan data skrining fitokimia

Dilakukan dengan cara analisis kualitatif yaitu menjelaskan kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada sampel nano ekstrak etanol 96% daun cemcem, seperti (alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid). Data yang diperoleh disajikan dalam tabel, dinarasikan dan dibandingkan dengan literatur terkait.

b. Pengolahan data aktivitas antioksidan nano ekstrak etanol 96% metode DPPH

Dilakukan dengan cara analisis kuantitatif. Hasil pengujian diukur secara numerik menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data berupa absorbansi larutan DPPH dengan dan tanpa sampel digunakan untuk menghitung % inhibisi dan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} memberikan gambaran konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas, yang merupakan parameter kuantitatif efektivitas antioksidan. Berikut rumus hitung persen inhibisi DPPH yaitu:

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Plot konsentrasi nanoekstrak vs. persen inhibisi untuk menentukan nilai IC_{50} (konsentrasi yang menghasilkan 50% inhibisi radikal bebas).

2. Analisis data

Analisis data pada hasil skrining fitokimia dilakukan secara deskriptif kualitatif dengan menjelaskan kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada nano ekstrak etanol 96% daun cemcem. Sedangkan kandungan aktivitas antioksidan pada nano ekstrak etanol 96% daun cemcem disajikan secara deskriptif kuantitatif. Penentuan aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus persamaan

linier, kemudian hasilnya diklasifikasikan berdasarkan kategori nilai IC_{50} , yang disajikan dalam tabel dan dinarasikan.

Tabel 3
Range Nilai IC_{50}

Nilai IC_{50} (ppm)	Kategori
<50	Sangat Kuat
50-100	Kuat
100-150	Sedang
150-200	Lemah
>200	Sangat Lemah

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Nano Ekstrak Etanol 96% Daun Cemcem

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah nano ekstrak etanol daun cemcem, sampel diperoleh dari daun cemcem dari Desa Penglipuran, Kabupaten Buleleng, pada penelitian ini daun cemcem yang diambil harus memenuhi kriteria inklusi yang telah ditentukan yaitu daun utuh berwarna hijau, tidak busuk, bebas dari serangan hama dan penyakit, segar, tidak kering, tidak berlubang, serta diambil mulai dari ujung daun sampai tangkai ke-5.



(a)



(b)

Gambar 4 (a) Daun cemcem segar, (b) Simplisia daun cemcem

Selanjutnya dilakukan uji kadar air, dan perhitungan rendemen yang disajikan pada tabel 4.

Tabel 4
Hasil Uji Kadar Air dan Rendemen

No	Pengujian	Hasil
1.	Kadar Air	4,384%
2	Rendemen	30,57%