

BAB III. Metodologi Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini meliputi penyiapan bahan, pemeriksaan karakterisasi simplisia, penapisan fitokimia, ekstraksi, fraksinasi, fraksinasi lanjutan, pemantauan ekstrak, fraksi dan sub-fraksi, pemurnian dan uji kemurnian, uji aktivitas antioksidan dari isolat, serta karakterisasi dan identifikasi isolat.

Selanjutnya tahap penyiapan bahan terdiri dari pengumpulan bahan, determinasi tanaman katuk, pembuatan simplisia yang meliputi sortasi basah, pencucian, pengeringan, sortasi kering, penghalusan sampai diperoleh serbuk simplisia, kemudian pengemasan dan penyimpanan.

Tahap karakterisasi simplisia yaitu penetapan kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar air dan penetapan susut pengeringan. Sedangkan penapisan fitokimia terdiri dari identifikasi alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tanin, dan triterpenoid/steroid.

Ekstraksi simplisia daun katuk dilakukan dengan cara dingin yaitu dengan maserasi dengan pelarut etanol 96%, kemudian dilakukan pemekatan ekstrak daun katuk menggunakan alat *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental daun katuk difraksinasi dengan metode Ekstraksi Cair-cair (ECC) menggunakan pelarut berturut-turut yang bersifat non polar, semi polar dan polar, masing-masing dilakukan sebanyak 3 kali secara bertahap. Hasil dari ECC kemudian dipekatkan kembali menggunakan *rotary evaporator*. Setelah itu dilakukan pemantauan ekstrak dan fraksi menggunakan KLT dengan fase diam silika gel F254 dengan pengembang yang sesuai dan disemprot dengan penampak bercak spesifik. Dilakukan uji aktivitas antioksidan secara kualitatif dengan penyemprotan pereaksi DPPH 0,2% dalam metanol. Fraksi yang memberikan warna kuning yang lebih pekat selanjutnya dilakukan menggunakan kromatografi kolom klasik.

Fraksinasi lanjutan dilakukan dengan metode Kromatografi Kolom Klasik (KK). Dilakukan pemantauan dengan KLT terhadap hasil KK dengan fase diam silika gel F254 dengan fase gerak yang sesuai yang kemudian disemprot dengan penampak bercak, hasil kromatografi diamati di bawah sinar UV λ 254 nm dan λ 366 nm.

Selanjutnya dilakukan pemurnian dan untuk uji kemurnian dilakukan dengan KLT pengembangan tunggal dengan tiga pengembangan yang berbeda dan KLT dua dimensi dengan penampak bercak H_2SO_4 10%.

Karakterisasi dan identifikasi isolat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, kemudian data yang diperoleh dibandingkan dengan pustaka