

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian bersifat eksperimental yang dilakukan dengan menentukan aktivitas antioksidan dari sampel ekstrak etanol daun adas dengan menggunakan dua metode DPPH dan FRAP.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **1. Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain : simplisia daun adas yang berasal dari Cepogo Boyolali Jawa Tengah, etanol p.a (*Emsure*®), DPPH (*Aldrich*),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (*Aldrich*), Buffer asetat (*Aldrich*),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (*Aldrich*), HCl (*E Merck*), TPTZ (*Aldrich*), dan aquadest steril (*Aldrich*), vitamin C (*Aldrich*) dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (*E Merck*).  $\text{FeCl}_3$  (*Aldrich*) dan plat silika gel.

##### **2. Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain : alat-alat gelas (Schoot Duran), spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S), kuvet, neraca analitik (ACIS), *water bath* (Memmert).

#### **3.3 Identifikasi Variabel Penelitian**

Variabel penelitian adalah poin-poin yang akan menjadi karakteristik suatu penelitian. Dalam penelitian ini ada dua jenis Variabel yaitu :

##### **1. Variabel Independen**

Variabel Independen yang juga sering disebut sebagai Variable bebas merupakan Variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab perubahannya atau timbulnya Variabel dependen (terikat). Adapun Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun adas dan vitamin C sebagai pembanding.

## 2. Variabel Dependen

Variabel Dependen (terikat) merupakan Variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, adanya Variabel bebas. Adapun Variabel terikat pada penelitian ini adalah persen (%) aktivitas antioksidan  $IC_{50}$  atau nilai  $IC_{50}$  pada pengujian aktivitas antioksidan.

### 3.4 Definisi Operasional

Definisi operasional yaitu definisi yang membatasi ruang lingkup atau Variabel-Variabel yang di teliti. Definisi operasional pada penelitian ini adalah:

#### 1. Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Adas

Konsentrasi ekstrak etanol daun adas adalah pembuatan lima seri konsentrasi yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis untuk mendapatkan absorbansi yang digunakan dalam persamaan regresi linier untuk menghasilkan nilai  $IC_{50}$ .

#### 2. *Inhibition Concentration 50% (IC<sub>50</sub>)*

*Inhibition concentration 50% (IC<sub>50</sub>)* dengan satuan  $\mu\text{g/mL}$  adalah nilai konsentrasi ekstrak etanol daun adas yang menghasilkan penangkapan 50% senyawa radikal.

### 3.5 Jalannya Penelitian

#### 1. Determinasi Tanaman

Determinasi Tanaman dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu.

#### 2. Penyiapan Sampel

Sebanyak 1 kg daun adas kering yang sudah di sortasi direndam dengan etanol 96% sebanyak 1 : 10 dalam maserator sambil diaduk-aduk tiap 12 jam lalu didiamkan selama 3 hari dan disaring. Maserat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai kental. Kemudian diperoleh ekstrak kental.

#### 3. Uji Pendahuluan Aktivitas Antioksidan

Identifikasi dengan kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan plat silika gel GF<sub>254</sub> yang mampu berfluorosensi di bawah lampu UV pada

panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Plat disiapkan dengan ukuran 2 cm × 8 cm menggunakan pensil, penggaris, dan cutter.

Selanjutnya plat diberi garis batas dengan jarak 1 cm pada bagian bawah plat dan 1 cm dari tepi atas plat silika gel GF<sub>254</sub> menggunakan pensil. Plat silika gel GF<sub>254</sub> diaktivasi terlebih dahulu di dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat.

Ekstrak kasar tanaman adas dilarutkan dengan pelarutnya (dibuat 200 mg dalam 10 mL pelarutnya). Kemudian ditotolkan sebanyak 5 µL pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat silika gel GF<sub>254</sub> menggunakan mikro pipet 5 µL. Ekstrak yang telah ditotolkan pada plat selanjutnya dielusi dengan dengan fase gerak. Adapun fase gerak yang digunakan adalah n-Hexana, etil asetat, aceton dengan perbandingan 4:6:1. Kemudian dilakukan penjuanan terlebih dahulu dalam suatu bejana tertutup selama 60 menit agar tekanan uap pada seluruh bagian bejana sama. Plat dimasukkan ke dalam great chamber yang berisi fase gerak yang telah dijenuhkan dan diletakkan pada jarak setinggi ± 1 cm dari dasar plat. Selanjutnya *great chamber* ditutup rapat dan dielusidasi hingga fase gerak mencapai jarak ± 1 cm dari tepi atas plat. Kemudian plat diangkat dan dikering anginkan.

Noda-noda yang terbentuk pada plat silika gel GF<sub>254</sub> kemudian diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Kemudian disemprot dengan penampak noda (DPPH) dikeringkan, kemudian diamati masing-masing noda yang terbentuk. Pengamatan noda meliputi jumlah noda, warna noda dan penghitungan nilai Rf noda (Maulana, 2018).

#### **4. Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH**

##### **a. Penyiapan sampel**

Ekstrak etanol daun adas ditimbang dengan 3 replikasi yang masing-masing 200 mg. Masing-masing ekstrak dilarutkan dalam etanol p.a sebanyak 10 mL. Kemudian dihomogenkan.

b. Pembuatan larutan pereaksi DPPH 0,4 mM

Pereaksi DPPH 0,4 mM dibuat dengan melarutkan 15,7 mg serbuk DPPH ke dalam 100 mL pelarut yang sesuai dengan pelarut sampel kemudian di homogenasi hingga larut sempurna (Murwanto dkk, 2012).

c. Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan stok DPPH 0,4 mM sebanyak 1,0 mL ditempatkan dalam labu takar 5,0 mL ditambah dengan etanol p.a sampai tanda, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450 - 545 nm terhadap blanko 5,0 mL etanol p.a, diplotkan harga absorbansi maksimum. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang dimana larutan cuplikan memiliki absorbansi maksimum (Qonitah, 2018)

d. Penentuan waktu inkubasi sampel

Larutan stok DPPH 0,4 mM sebanyak 1,0 mL ditambahkan 50 mikro sampel kemudian ditambahkan etanol p.a sampai 5,0 mL kemudian divorteks selama 30 detik dan di ukur pada panjang gelombang maksimum, diplotkan dengan harga absorbansi dengan waktu. Pada penelitian ini, mengacu pada penelitian Molyneux (2004) yaitu waktu inkubasi 30 menit. Waktu inkubasi adalah waktu yang dibutuhkan dari awal hingga akhir untuk mendapatkan absorbansi yang stabil dan bereaksinya senyawa dengan preaksi.

e. Penentuan aktivitas antiradikal

Beberapa seri konsentrasi sampel dalam rentang 100-1000  $\mu\text{g/mL}$  yang telah dibuat ditambah 1,0 mL DPPH 0,4 mM dan etanol p.a hingga 5,0 mL. Campuran divortek selama 30 detik dan diinkubasi selama operating time (30 menit). Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum terhadap blanko (etanol p.a). Dilakukan juga pengukuran absorbansi kontrol yang terdiri atas 1,0 mL DPPH dan etanol p.a hingga 5,0 mL pada waktu tertentu.

f. Analisis perhitungan  $IC_{50}$

Dalam perhitungan DPPH besarnya aktivitas peredaman radikal menurut Sreenivasan *et al* (2007) dihitung dengan rumus:

$$(\%) \text{ perendaman} = \frac{(A_{Kontrol} - A_{sampel})}{A_{Kontrol}} \times 100\%$$

$IC_{50}$  adalah konsentrasi ekstrak daun adas yang menghasilkan penangkapan 50% senyawa radikal, yang dibandingkan dengan kontrol melalui suatu persamaan garis regresi linier antara kadar terhadap persen penangkap radikal (Haryoto dkk, 2009).

Nilai *Inhibitory concentration 50* ( $\%IC_{50}$ ) diperoleh dari persamaan regresi linier antara persen penangkap radikal sebagai Y dan konsentrasi ekstrak sebagai X. Nilai  $IC_{50}$  sebagai indikasi terhadap besarnya aktivitas antioksidan kecilnya nilai  $IC_{50}$  mengindikasikan aktivitas antioksidan yang besar (Haryoto dkk, 2009).

## 5. Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode FRAP

### a. Pembuatan Larutan

#### 1) Buffer Asetat

Buffer asetat dengan pH 3,6 dibuat dari 0,775 gram natrium asetat trihidrat ( $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ ) yang ditambahkan dengan 4 mL asam asetat pekat dan dilarutkan dengan aquades hingga tepat 250 mL dalam labu takar (Samosir, 2012).

#### 2) Larutan 10 mmol/L 2,4,6-tripyridil-striazine (TPTZ)

Sebanyak 31 mg TPTZ dilarutkan dalam 40 mmol/L HCl hingga tepat 10 mL. Larutan 40 mmol/L HCl dibuat dengan melarutkan 380  $\mu$ L HCl pekat dalam 100 mL aquades (Samosir, 2012).

#### 3) Larutan 20 mmol/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

Sebanyak 32,44 mg  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  dilarutkan dengan buffer asetat dalam labu takar hingga tepat 10 mL.

#### 4) Reagen FRAP

Reagen FRAP dibuat dengan cara mencampurkan 25 mL buffer asetat, 2,5 mL larutan TPTZ dan 2,5 larutan  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , lalu

ditambahkan aquades hingga tepat 100 mL dalam labu takar (Samosir, 2012).

5) Pembuatan Larutan Standar  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Larutan stock 1000 ppm  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dibuat dengan melarutkan 100 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dalam 100 mL aquades. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 100-1000  $\mu\text{mol/L}$  (Samosir, 2012).

6) Penentuan Aktivitas Antioksidan

Beberapa seri konsentrasi 100-1000  $\mu\text{g/mL}$  yang telah dibuat ditambah 3 mL FRAP dan etanol pa hingga 5,0 mL. Campuran divortek 30 detik dan di inkubasi selama operating time (30 menit). lalu dibaca pada setiap panjang gelombang dalam kisaran 588 - 598 nm dengan menggunakan spektrofotometer visibel (Samosir, 2012).

7) Analisis perhitungan  $\text{IC}_{50}$

Perhitungan FRAP diperoleh dari data absorbansi terhadap pengenceran serial Ferrous Sulfat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) dan catat setara dengan  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ . Konsentrasi efektif  $\text{IC}_{50}$  dari nilai FRAP adalah konsentrasi sampel yang diperlukan untuk mengurangi 0,5 mol  $\text{Fe}^{3+}$  menjadi  $\text{Fe}^{2+}$  (Karim *et al.*, 2014).

### 3.6 Analisis data

Data yang diperoleh dari pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan analisis statistik pada uji Independen *T-test*. Dalam penelitian ini uji Independen *T-test* digunakan untuk membandingkan apakah terdapat perbedaan signifikan aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol daun adas dengan menggunakan metode DPPH dan FRAP.