

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*) untuk menguji aktivitas antioksidan yang terkandung dalam ekstrak propolis berdasarkan lama waktu panen.

B. Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada Bulan Mei 2020 sampai Juni 2020 di Laboratorium Kimia Farmasi Prodi Farmasi Fakultas Sains, Teknologi dan Kesehatan Univeritas Sahid Surakarta.

C. Alat Dan Bahan Penelitian

Alat –alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: tabung reaksi, erlemeyer, gelas ukur, beker glas, mikro pipet, kuvet, timbangan analitik (AND GF-300), Spektrofotometer *UV – Vis* (Genesys), alat Evaporator (Memmert).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah propolis yang dipanen 6 bulan dan 1 tahun asal Desa Alastuwo Magetan untuk dijadikan ekstrak propolis, etanol 96 % (Medika), DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Merck), Aqua *ProInjection* (Ikapharmindo) dan Vitamin C (Merck).

D. Jalanya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak propolis

Sampel propolis yang baru dipanen 6 bulan dan 1 tahun masing-masing dipotong menjadi ukuran lebih kecil, dikeringkan di bawah sinar matahari tidak langsung kemudian di gerus.

Ekstrak propolis dibuat dengan metode maserasi. Ditimbang sejumlah 200 gram (propolis 6 bulan) dan 200 gram (Propolis 1 tahun). Propolis yang sudah ditimbang dimasukan ke dalam gelas ukur ditambah 1000 ml etanol 96 % sampai terendam semua, diaduk berkala selama 7 hari. Hasil rendaman disaring menggunakan kertas saring, diambil filtratnya. Filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator* suhu 60 °C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental diamati secara organoleptik, kemudian disimpan di lemari pendingin untuk persiapan uji antioksidan dan dihitung rendemennya.

$$\text{Nilai Rendemen} = \frac{(\text{Bobot akhir ekstrak propolis})}{\text{Bobot awal propolis}} \times 100\%$$

2. Pembuatan Laruran DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Larutan DPPH konsentrasi 0,4 mM dibuat dengan cara ditimbang 0,0157 gram DPPH dalam botol gelap, kemudian dilarutkan dalam 100 mL etanol 96 % dan dikocok sampai homogen, diletakkan pada

suhu rendah, ditutup dengan aluminium foil dan segera digunakan.
(Murwanto dan Santoso, 2012)

3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH konsentrasi 0,4 mM ditentukan absorbansinya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 400-600 nm. Berdasarkan absorbansi tertinggi maka dapat ditentukan panjang gelombang maksimum dari larutan DPPH tersebut.

4. Penentuan *Operating Time* (*OT*)

Penentuan *operating time* larutan kontrol DPPH dilakukan dengan cara dipipet 0,5 mL larutan DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur kemudian ditambahkan dengan etanol 96% hingga 5 mL. Setelah itu dihomogenkan dan ditutup dengan aluminium foil kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam ruang gelap selama 30 menit, diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH setiap 5 menit hingga 60 menit. *Operatig time* ditentukan saat diperoleh absorbansi yang stabil yaitu tidak terlihat adanya penurunan absorbansi.

5. Pembuatan Larutan Uji/ Sampel Ekstrak Propolis

Ekstrak kental propolis dibuat larutan stok dengan konsentrasi 10.000 ppm, dengan cara ditimbang 100 mg ekstrak kental propolis

panen 6 bulan dan 1 tahun, masing-masing dilarutkan dengan menambahkan etanol 96 % hingga 10 mL. Kemudian larutan stok di encerkan menjadi 5 seri konsentrasi ; 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm.

6. Analisa Kualitatif Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

Uji kualitatif bertujuan untuk mengetahui kemampuan larutan uji atau sampel dalam meredam radikal DPPH. Sejumlah larutan sampel dimasukkan dalam labu takar bersih dan kering, kemudian ditambahkan larutan DPPH sebanyak 0,5 mL dan etanol hingga 5 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 10 ppm , 20 ppm , 50 ppm 100 ppm dan 200 ppm. Diamati perubahan warna yang terjadi, apabila warna cepat memudar maka larutan uji sampel berpotensi meredam DPPH dan dapat dilakukan uji kuantitatif. Sebagai kontrol digunakan 0,5 mL larutan DPPH yang ditambahkan etanol 96 % hingga 5 mL.

7. Pembuatan Larutan Pembanding (Vitamin C)

Larutan standar vitan C dengan konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 100 mg vitamin C, ditambahkan etanol 96 % hingga 100 mL. Kemudian larutan diencerkan menjadi 6 seri konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm dan 6 ppm.

8. Uji Aktivitas Antioksidan.

➤ Pengukuran Absorbansi Larutan Uji Ekstrak Propolis

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan sesuai Thamrin (2016) dengan sedikit modifikasi. Pengukuran absorbansi larutan uji ekstrak propolis panen 6 bulan dan 1 tahun dibuat masing-masing dalam 5 seri konsentrasi ; 10 ppm , 20 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm. Larutan konsentrasi 10 ppm dibuat dengan cara dipipet 5 μ L larutan induk, Larutan konsentrasi 20 ppm dibuat dengan cara dipipet 10 μ L larutan induk. Larutan konsentrasi 50 ppm dibuat dengan cara dipipet 25 μ L larutan induk. Larutan konsentrasi 100 ppm dibuat dengan cara dipipet 50 μ L dan terahir larutan konsentrasi 200 ppm dibuat dengan cara dipipet 100 μ L larutan induk. Masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambah dengan 0,5 mL larutan DPPH dan ditambahkan etanol 96 % hingga 5 mL. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan dan ditutup alumunium foil. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit dalam ruang gelap. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum pada spektrofotometer *UV-Vis*. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan tiga kali pengulangan (triplo).

➤ Pengukuran Absorbansi Larutan Pembanding Vitamin C

Larutan pembanding vitamin C konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm , 4 ppm, 5 ppm dan 6 ppm masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur, kemudian ditambahkan dengan 0,5 mL larutan DPPH dan etanol

96 % hingga 5 mL, larutan dihomogenkan dan ditutup dengan aluminium foil. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit dalam ruang gelap. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum 513 nm pada spektrofotometer *UV-Vis*. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan tiga kali pengulangan (triplo).

E. Analisa Data Antioksidan

Analisa data antioksidan penangkap radikal DPPH (% hambatan) ekstrak propolis dianalisis dan hitung nilai IC_{50} nya melalui analisa probit. Perhitungan aktivitas hambatan radikal bebas DPPH diukur dari peredaman warna ungu merah dari DPPH dengan rumus:

$$(\%) \text{ Hambatan} = \frac{(A \text{ Kontrol} - A \text{ sampel})}{A \text{ kontrol}} \times 100\%$$

Dari harga persentase hambatan pada berbagai konsentrasi, dibuat kurva konsentrasi larutan uji (x) vs % hambatan (y), sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = a + bx$. Hitung harga IC_{50} dengan memasukan $y = 50$ (Probit dari 50 %) pada persamaan regresi linier. Semakin kecil nilai IC_{50} menandakan semakin tinggi aktivitas antioksidan senyawa tersebut. Klasifikasi antioksidan menurut Thamrin dkk. (2016) terlihat seperti pada Tabel 3.1. berikut.

Tabel 3.1 Klasifikasi Antioksidan

No	Nilai IC_{50}	Antioksidan
1	< 50 ppm	Sangat kuat
2	50 – 100 ppm	Kuat
3	100 – 150 ppm	Sedang
4	151 – 200 ppm	Lemah

F. Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah poin-poin yang akan menjadi karakteristik suatu penelitian. Dalam penelitian ini ada 2 jenis variabel yaitu:

1. Variabel Independen

Variabel independen yang juga sering disebut sebagai variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen (terikat). Adapun variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak propolis 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.

G. Definisi Operasional

Definisi operasional yaitu definisi yang membatasi ruang lingkup atau variabel variabel yang diteliti. Definisi operasional pada penelitian ini adalah:

1. Konsentrasi Ekstrak Propolis

Konsentasi Ekstrak Propolis adalah konsentrasi yang diukur dalam menentukan nilai IC_{50}

2. *Inhibitory Concentration 50* (% IC₅₀)

Inhibitory Concentration 50 (% IC₅₀) adalah nilai konsentrasi ekstrak propolis yang memberikan % aktivitas antioksidan sebesar 50% (meredam 50% aktivitas dari DPPH) dibanding kontrol melalui persamaan garis regresi linear antara kadar terhadap persen penangkap radikal.

3. Kemampuan IC₅₀

Suatu senyawa dikatakan sebagai senyawa dengan kemampuan antioksidan yang sangat kuat apabila memiliki nilai IC₅₀ < 50 µg/ mL, antioksidan kuat antara 50-100 µg /mL, antioksidan sedang dengan nilai IC₅₀ antara 101-250 µg /mL, antioksidan lemah apabila nilai IC₅₀ antara 250-500 µg /mL, antioksidan sangat lemah bila nilai IC₅₀ > 500 µg/mL seperti yang dijelaskan dalam buku Prinsip dasar pemeriksaan Radikal Bebas dan antioksidan.(Yuslianti, 2018)