

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode DPPH (*2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl*) untuk menguji korelasi antara fenolik madu dari desa Alastuwo dan Malang terhadap aktivitas antioksidannya.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan April-Mei 2020 di Laboratorium Farmasi, Fakultas Sains Teknologi dan Kesehatan Univeritas Sahid Surakarta.

3.3. Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, batang pengaduk, kuas, rak tabung, tabung reaksi, corong, pipet tetes, erlemeyer, gelas ukur, *becker glass*, mikro pipet, kuvet, spektrofotometri *UV – Vis (Genesys)*, Labu takar.

3.3.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah madu Alastuwo dan Malang, kertas saring Whatman, asam galat, etanol 96% (Medika), *Aqua Pro Injection* (Ika Pharmindo), aluminium foil, DPPH (2-2

diphenyl 1 picrylhydrazyl) (Merck), *Folin Ciocalteu* (Merck), vitamin C (Merck).

3.4. Identifikasi Variabel Penelitian

Penelitian ini diantaranya :

1. Variabel Independen (Bebas)

Variabel Independen adalah konsentrasi atau kadar madu dari Malang dan Alastuwo.

2. Variabel Dependen (Terikat)

Variabel Dependen adalah persen (%) aktivitas antioksidan IC_{50} dan kadar fenolik total madu

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali adalah lokasi pengambilan sampel, lama inkubasi, pereaksi kandungan fenolik dan pereaksi uji antioksidan metode DPPH

3.5. Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi madu

Konsentrasi madu adalah konsentrasi madu yang digunakan dalam pengujian kandungan fenolik dan aktivitas antioksidan metode DPPH.

2. *Inhibitory Concentration 50* (% IC_{50})

Inhibitory Concentration 50 (% IC_{50}) adalah nilai konsentrasi madu 'x' 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. Fenolik Total

Analisis kandungan total senyawa fenolat dapat ditentukan secara spektrofotometri dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu akan membentuk warna biru kompleks yang dapat menyerap radiasi sehingga bisa diukur (Pontis, J.A., dkk, 2014). Digunakan pembanding asam galat, kandungan fenolat total dalam tumbuhan dinyatakan dalam GAE (*gallic acid equivalent*) yaitu jumlah kesetaraan milligram asam galat dalam 1 gram (Gheldof & Engeseth, 2002)

3.6. Cara Kerja Penelitian

3.6.1. Penyiapan Sampel

Madu didapat dari peternak asal desa Alastuwo Magetan dan Malang yang baru dipanen. Kemudian dimasukkan botol kaca bening, ditutup Koran untuk menghindari sinar matahari. Madu disimpan di suhu ruang sampai waktu akan digunakan.

3.6.2. Langkah Penelitian

a. Analisis Kualitatif Senyawa Fenolat pada Madu dengan Reaksi Warna.

Sampel dipipet 2.0 mL, kemudian dimaserasi dengan etanol 3.0 mL, dan dikocok. Ekstrak tersebut diteteskan pada plat tetes dan ditambahkan dengan larutan FeCl₃ 5% sebanyak 3-5 tetes. Uji positif adanya senyawa fenolat ditunjukkan jika terjadi perubahan warna menjadi hijau, biru, ungu atau hitam.

b. Pembuatan Larutan Standart Asam Galat.

Larutan stok asam galat dibuat dengan konsentrasi 100 ppm (mg/L), dengan melarutkan 0,01 g asam galat dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquades sampai tanda batas. Kemudian dibuat seri konsentrasi: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0;10 ppm.

c. Penentuan Kandungan Fenolik Total**1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.**

Larutan stok asam galat 4 ppm diukur serapannya pada panjang gelombang 700 nm – 780 nm dengan interval tertentu. Hasil yang diperoleh dibuat dalam bentuk kurva, sebagai sumbu y adalah absorbansi dan panjang gelombang cahaya sebagai sumbu x. Dari kurva tersebut dapat ditentukan panjang gelombang maksimum.

2. Pembuatan Kurva Standar Asam Galat

Larutan stok asam galat 100 ppm diambil sebanyak 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mL masing-masing ditambahkan dengan reagen folin sebanyak 0.8 mL dan dimasukkan ke labu ukur 10 mL. Selanjutnya ditambahkan Na_2CO_3 5% hingga tanda batas. Sehingga larutan kurva baku mempunyai konsentrasi 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 ppm. Masing-masing larutan didiamkan 60 menit, dan serapannya diukur pada panjang gelombang maksimum. Dengan meregresikan absorbansi terhadap konsentrasi, dapat diperoleh kurva kalibrasi dengan persamaan regresi $y = bx + a$.

3. Penentuan Kadar Fenolik Total

Penetapan kadar fenolik total dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu. Sampel madu sebanyak 0,2g ditimbang di timbangan analitik dan dilarutkan dalam etanol 96% dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas, campuran disaring, filtrate dipipet 1,0 mL kemudian ditambahkan dengan reagen folin 0,8 mL, dimasukkan labu ukur 10 mL. Setelah itu campuran dikocok. selanjutnya ditambahkan 2 mL Na_2CO_3 5% sampai tanda batas, larutan didiamkan 60 menit dan serapannya diukur pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Konsentrasi senyawa fenolat dalam sampel dapat ditentukan dengan mengalurkan absorbansi sampel pada kurva kalibrasi.

d. Uji Aktivitas Antioksidan

1) Pembuatan Larutan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil*) 0,4 mM

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 0,0157 g kemudian dilarutkan dengan etanol 96% dalam labu ukur hingga volume 100 mL lalu dihomogenkan. Setelah itu diukur absorbansi larutan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dengan spektrofotometer *UV-Vis* untuk memperoleh panjang gelombang maksimum 513 nm. Larutan tersebut harus segera digunakan dan dijaga suhu rendah serta terlindung cahaya.

2) Larutan kontrol DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil)

Diambil 500 uL larutan DPPH dimasukkan ke dalam takar 5 mL dan ditambahkan etanol 96 % hingga batas 5 mL lalu dikocok sampai homogen.

3) Pembuatan Larutan Uji / Sampel Madu

Dibuat larutan stok madu konsentrasi 20.000 ppm dengan cara ditimbang 200 mg madu dilarutkan dengan etanol 96% pada labu ukur 10 ml hingga didapatkan konsentrasi madu 20.000 ppm. Kemudian larutan stok madu dibuat 5 seri konsentrasi: 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, dan 500 ppm.

4) Pembuatan Larutan Pembanding (Vitamin C)

Larutan standar asam askorbat dengan konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 1ml sediaan ampul 5 mg, ditambahkan etanol 96% sampai 100 ml. Kemudian larutan diencerkan menjadi 6 konsentrasi : 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 ppm.

e. Uji Analisis Aktivitas Antioksidan madu dengan metode DPPH

Larutan blanko, kontrol, uji dan pembanding di inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dalam kondisi gelap. Ditutup dengan aluminium foil, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer *UV-Vis*. (Tristantini dkk, 2016)

1) Pengukuran Absorbansi Larutan Kontrol

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara larutan DPPH dipipet sebanyak 500 μL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan etanol 96% sampai 5 mL. Setelah itu dihomogenkan dan ditutup dengan aluminium foil kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam ruang gelap selama 30 menit. Serapan larutan kontrol diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 513 nm.

2) Pengukuran Absorbansi Larutan Uji Madu

Pengukuran absorbansi larutan uji madu dibuat 5 seri konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 ppm. Larutan konsentrasi 100 ppm dibuat dengan cara dipipet 5 μL larutan induk. Larutan konsentrasi 200 ppm dibuat dengan cara dipipet 10 μL larutan induk, Larutan konsentrasi 300 ppm dibuat dengan cara dipipet 25 μL larutan induk. Larutan konsentrasi 400 ppm dibuat dengan cara dipipet 50 μL larutan induk. Larutan konsentrasi 500 ppm dibuat dengan cara dipipet 100 μL larutan induk. Campuran tersebut kemudian diaduk rata dengan menggunakan pipet ditutup aluminium foil. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dalam ruang gelap. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 513 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan tiga kali pengulangan.

3) Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Asam Askorbat

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara larutan standar asam askorbat 1,0 ppm, 2,0 ppm, 3,0 ppm , 4,0 ppm, 5,0 ppm dan 6,0 ppm masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 500 μ L mL larutan DPPH dan etanol 96% sampai 5000 μ L, 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.

3.7. Analisa Data

Aktivitas antioksidan sampel dihitung dengan rumus :

$$(\%) \text{ Peredaman} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100$$

Dimana A_c adalah Absorbansi kontrol dan A_s adalah Absorbansi sample (Hussein dkk, 2011).

Dari harga % peredaman pada berbagai konsentrasi dibuat kurva konsentrasi larutan uji vs % peredaman kemudian dihitung regresinya dan ditentukan nilai IC_{50} .