

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk kedalam penelitian eksperimental yang dilakukan di Laboratorium. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia di Universitas Sahid Surakarta pada bulan Januari – Mei 2022 dengan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah Jantung Pisang Nangka, Ambon, dan Tanduk.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah ekstrak etanol Jantung Pisang Nangka, Ambon, dan Tanduk.

3.3 Instrumen Penelitian

3.3.1 Alat

Alat-alat yang akan digunakan pada penelitian kali ini adalah sendok tanduk, bejana maserasi, batang pengaduk, termometer, penangas air, timbangan analitik (*Kern*), blender (*Panasonic*), botol

kaca gelap, *rotary evaporator* (*Dragon Onemed, DLAB*), spektrofotometer *UV-Vis* (*Genesys 10S*), ayakan 40 mesh, alat-alat gelas (*Pyrex*), alumunium foil, pipet mikro (*Dragon Onemed, DLAB*), kuvet (*Quartz Kuvet*).

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi simplisia Jantung Pisang Nangka, Ambon, dan Tanduk, aquades, etanol PA 99,95% (*Merck*), etanol 96% (*Rahma Sari*), vitamin C (*Merck*), DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) (*Merck*).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak etanol jantung pisang nangka, ambon, dan tanduk dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, dan 400 ppm.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

3.5 Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol jantung pisang nangka, ambon, dan tanduk adalah ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk simplisia jantung pisang nangka, ambon, dan tanduk menggunakan etanol 96 %. Variasi konsentrasi

ekstrak etanol jantung pisang nangka, ambon, dan tanduk yang digunakan adalah 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, dan 400 ppm.

- b. Aktivitas antioksidan kemampuan suatu senyawa untuk meredam radikal bebas dan dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin tinggi kemampuan untuk menangkal radikal bebas.
- c. DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) merupakan senyawa radikal yang dapat digunakan sebagai indikator proses reduksi senyawa antioksidan. Penentuan nilai IC_{50} menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* dengan pemantauan absorbansi DPPH pada panjang gelombang 517 nm.

3.6 Rencana Jalan Penelitian

3.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Jantung Pisang Nangka, Ambon, dan Tanduk

a. Determinasi Tanaman

Jantung pisang nangka, ambon dan tanduk yang digunakan pada penelitian ini berasal dari wilayah Kecamatan Tempursari, Kabupaten Lumajang dan dideterminasi di UPT (unit pelaksanaan teknis) Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Sampel yang dipastikan benar sebagai Jantung pisang nangka, ambon dan tanduk (*Musa paradisiaca sp*)

b. Pengolaan Sampel

Jantung pisang nangka, ambon dan tanduk yang telah dideterminasi dan dipastikan benar diambil masing-masing sebanyak

1,5 kg lalu disortasi basah, kemudian dicuci dan dirajang lalu dikeringkan di tempat yang tidak terkena sinar matahari secara langsung. Setelah kering, ditimbang dan diperoleh berat simplisia jantung pisang nangka, ambon dan tanduk. Sampel dibuat serbuk dengan menggunakan blender, lalu diayak dengan ayakan 40 *mesh*, dan diekstraksi dengan cara maserasi (Putra *et al.*, 2014).

c. Ekstraksi Sampel

Sebanyak 300 gram serbuk simplisia jantung pisang nangka, ambon dan tanduk dimasukkan dalam bejana maserasi, lalu serbuk ditambahkan etanol 96 % sebanyak 1500 mL. Bejana maserasi ditutup rapat kemudian disimpan pada tempat yang terhindar sinar matahari langsung selama 5 x 24 jam sambil sekali-kali diaduk. Setelah 5 hari campuran disaring dan diambil filtratnya. Ampas dilakukan remaserasi menggunakan etanol 96 % sebanyak 1500 mL. Hasil maserat disimpan dalam bejana tertutup dan gelap selama 2 hari, kemudian diuapkan dengan penangas air sampai diperoleh ekstrak kental (Adhayanti *et al.*, 2018).

$$\% \text{ Rendemen} = \left(\frac{\text{bobot total ekstrak}}{\text{bobot total simplisia}} \right) \times 100\%$$

3.6.2 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

Sebanyak 15,7 mg DPPH ditimbang kemudian dilarutkan dengan etanol pa dilabu ukur 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi

0,4 mM. Larutan DPPH disimpan dalam wadah kaca yang terlindung dari cahaya matahari (Patria dan Soegihardjo, 2013).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Sebanyak 2 mL larutan DPPH dari larutan induk ditambah etanol 3 mL di labu ukur 5 mL kemudian dihomogenkan dan diamkan ditempat gelap sampai 30 menit. Selanjutnya diamati absorbansinya pada rentang λ 400 - 800 nm (Fathurrachman, 2014)

c. Penetapan *Operating Time* (OT)

Sebanyak 2 mL larutan DPPH dari larutan induk ditambah etanol 3 mL di labu ukur 5 mL kemudian gojog sampai homogen. Diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum sampai diperoleh absorbansi yang relatif konstan dengan rentang pembacaan setiap 1 menit sekali selama 60 menit. Diperoleh OT 30 menit. (Sayuthi dan Puji, 2017).

d. Pembuatan Kontrol DPPH

Sebanyak 2 mL larutan DPPH dari larutan induk ditambah etanol 3 mL di labu ukur 5 mL kemudian gojog sampai homogen diwadah gelap. Larutan kontrol DPPH digunakan sebagai kontrol saat melakukan uji pada sampel penelitian (Hilma *et al.*, 2016).

e. Pembuatan Kontrol Positif Vitamin C

Kontrol positif yaitu menggunakan Vitamin C. Sebanyak 50 mg vitamin C dilarutkan dengan 50 mL akuades sebagai larutan induk.

Kemudian dibuat seri konsentrasi 5 ppm, 7,5 ppm, 10 ppm, 12,5 ppm, dan 15 ppm (Ferdinan dan Prasetya, 2018).

- f. Pembuatan larutan uji ekstrak etanol Jantung Pisang Nangka, Ambon, dan Tanduk

Ekstrak kental sebanyak 25 mg dimasukkan ke dalam masing-masing labu ukur 25 mL dan dilarutkan dengan etanol sampai tanda batas. Dibuat seri konsentrai 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, dan 400 ppm dilabu ukur 5 mL dilarutkan dengan pelarut etanol hingga 5 mL dan dilakukan replikasi (Ferdinan dan Prasetya, 2018).

- g. Pengujian Aktivitas Antioksidan sampel

Masing-masing konsentrasi masukkan kedalam labu ukur 5 mL sebanyak 3 mL, kemudian ditambah 2 mL larutan DPPH. Larutan tersebut kemudian dihomogenkan dan diamkan selama 30 menit ditempat yang gelap, lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 517 nm dan dilakukan replikasi (Rizkayanti *et al.*, 2017).

- h. Penentuan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*)

Data yang diperoleh dari pengukuran antioksidan dihitung dengan menggunakan % inhibisi untuk menentukan nilai IC_{50} . Data persen inhibisi dari pengujian yang dilakukan dihitung dengan rumus yaitu (Hilma *et al.*, 2016) :

$$\% \text{ inhibisi radikal bebas DPPH} = \left(\frac{\text{Absorban Kontrol DPPH} - \text{absorban sampel}}{\text{Absorban Kontrol DPPH}} \right) \times 100\%$$

Perhitungan nilai IC₅₀ diperoleh dari persamaan regresi yang menyatakan hubungan antara konsentrasi ekstrak (x) dengan persen inhibisi (%) aktivitas antioksidan (y) (Himawan *et al.*, 2018).

Tabel 3.1 Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ (ppm)	Kategori Antioksidan
< 50	Sangat Aktif
50 – 100	Aktif
101 – 250	Sedang
250 – 500	Lemah
> 500	Tidak Aktif

(Fathurrachman, 2014)

3.7 Analisa Data

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini adalah uji *Kruskal-Wallis* dengan taraf kepercayaan 95 % dan didahului uji normalitas (*Shapiro Wilk*) dan uji homogenitas (*Levene's Test*). Data yang diperoleh normal dan tidak homogen maka uji bisa dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* dengan *p-value* < 0,05 yang bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan aktivitas antioksidan ekstrak etanol jantung pisang nangka, ambon dan tanduk. Data yang diperoleh memiliki hasil yang normal dan tidak homogen maka diuji menggunakan uji *Kruskal-Wallis* (Salamah dan Widyasari, 2015).