

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental terkait aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol kulit batang mahoni daerah Sragen dan Karanganyar menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin*). Penelitian dilakukan pada tanggal 18 Juli hingga 2 September 2022 di Laboratorium kimia farmasi program studi farmasi fakultas sains, teknologi, dan kesehatan Universitas Sahid Surakarta.

3.2 Populasi Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi

Kulit batang mahoni dari Sragen dan Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah

3.2.2 Sampel

Ekstrak etanol 96% ekstrak etanol kulit batang mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.) daerah Sragen dan Karanganyar.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas (pyrex), neraca analitik (acis), mortir (lokal), pisau (lokal), corong *buchner vacuum* (pyrex), *rotary evaporator*

vacuum (bio base), corong pisah (pyrex), desikator, oven (marnert) dan spektrofotometer *UV-Vis* (Genesys 10S).

3.3.2 Bahan

Ekstrak etanol kulit batang mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.), etanol 96% (medika), dragendrof (*merk*), serbuk Mg, HCl pekat, FeCl₃ 1% (*merk*), (CH₃COO)₂O (*merk*) petroleum eter (*merk*), *aqudest* (*brataco*), etanol pa, DPPH (*1,1 dyphenyl-2-picryl-hidrazyl*) (*Aldrich*), dan vitamin C pa.

3.4 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel yang mempengaruhi atau menjadi terjadinya perubahannya atau variabel terikat. Adapun variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit batang mahoni yang didapatkan dari 2 sampel yaitu berasal dari Sragen yang merupakan daerah dataran rendah dan berasal dari Karanganyar yang merupakan daerah dataran tinggi.

b. Variabel Terikat

Variabel Terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan uji kualitatif berupa uji flavonoid dan fenolik.

3.5 Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol kulit batang mahoni yang didapatkan berasal dari Sragen dan Karanganyar dimaserasi menggunakan etanol 96% hingga mendapatkan ekstrak cair dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental.
- b. Uji Kualitatif berupa uji flavonoid dan uji fenolik pada ekstrak etanol kulit batang mahoni menggunakan reaksi warna.
- c. Aktivitas Antioksidan

Aktivitas Antioksidan didapatkan dengan melakukan uji kuantitatif yaitu menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang dilihat pada nilai IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal bebas DPPH sebanyak 50% konsentrasi awal sehingga semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidan semakin besar (Mendhekar *et al.*, 2017).

3.6 Jalannya Penelitian

3.6.1 Pengumpulan sampel

Kulit batang mahoni yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari daerah Sumberlawang, Sragen dan daerah Tawangmangu, Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

3.6.2 Determinasi Tanaman

Determinasi Kulit Batang Mahoni dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Setia Budi, Surakarta, Jawa Tengah.

3.6.3 Pembuatan Ekstraksi Sampel Kulit Batang Mahoni

Pembuatan ekstrak dibuat dengan perbandingan 1: 5 yaitu sebanyak 400 gram simplisia kulit batang mahoni yang telah diserbuk, dimaserasi dengan 2 liter etanol 96%. Didiamkan 3 x 24 jam setelah itu disaring dan maserat hasil ekstraksi dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 60 °C sampai diperoleh ekstrak kental (Qonitah F, 2019). Kemudian dipekatkan lagi menggunakan *waterbath* untuk kemudian dihitung % rendeman menggunakan rumus:

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{bobot total ekstrak}}{\text{bobot total simplisia}} \times 100\% \text{ (Yuliani, 2016).}$$

3.6.4 Uji Flavonoid dan Uji Fenolik

a. Uji Flavonoid

Pengujian flavonoid dilakukan dengan menggunakan 5 mL ekstrak ditambahkan dengan 2 mL air panas, dididihkan Selama 5 menit. Kemudian disaring, filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg (Magnesium) dan 1 mL HCl pekat. Kemudian dikocok kuat-kuat, uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau jingga (Minarno, 2015).

b. Uji Fenolik

Sebanyak 5 mL ekstrak ditambahkan 10 tetes FeCl₃ 1%. Uji positif ekstrak mengandung fenol terbentuk menghasilkan warna hitam pekat (Wulan agustina *et al*, 2017).

3.6.5 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

a. Larutan DPPH 0,4 mM

Sebanyak 15,7 mg DPPH ditimbang kemudian masukkan kedalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga tanda batas lalu botol ditempatkan pada botol kaca berwarna gelap (Pogaga *et al.*, 2020).

b. Pembuatan larutan blanko

Sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dipipet dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL kemudian dilarutkan menggunakan etanol p.a hingga tanda (Utami, 2018).

c. Pembuatan larutan pembanding vitamin C

Sebanyak 10 mg vitamin C ditimbang lalu masukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dilarutkan ke dalam etanol pa hingga batas tanda (1000 ppm). Larutan dibuat dengan menggunakan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm dan ditambahkan 1 ml DPPH 0,4 mM yang diencerkan menggunakan etanol pa pada labu ukur 5 mL.

d. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ max)

Penetapan panjang gelombang optimum dilakukan menggunakan gelombang maksimum (λ max) sebagai penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH dilakukan dengan mengambil 1 mL larutan DPPH dari stok DPPH yang dibuat, kemudian ditambahkan etanol pa pada labu ukur ad 10 mL kemudian

dikocok homogen dan diukur serapannya yang diperoleh pada rentang λ 510 - 520 nm dengan blanko etanol (Yuliani, 2015).

e. Penentuan *operating time*

dilakukan dengan mengambil 1 mL larutan DPPH dari stok DPPH yang dibuat, kemudian ditambahkan etanol pada labu ukur ad 10 mL kemudian dikocok homogen. Larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60. Serapan yang tetap dicatat dan digunakan sebagai ukuran waktu pembacaan absorbansi pada pembuatan kurva baku dan penetapan kadar sampel (Susiloningrum & Sari, 2021).

f. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit batang mahoni

Sebanyak 10 mg ekstrak ditimbang lalu dilarutkan dalam etanol 96% dalam labu ukur 10 mL hingga batas tanda (1000 ppm). Larutan ekstrak yang sudah dibuat dengan konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 30 ppm yang kemudian masing-masing dipipet kedalam ukur 5 mL hingga tanda batas. Sampel kemudian dipipet sesuai perhitungan kemudian ditambahkan kedalam tabung reaksi yang berisi larutan DPPH sebanyak 1 mL kemudian ditutup *aluminium foil* lalu divortex dan didiamkan selama 35 menit kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometri *UV-VIS* dengan panjang gelombang 517 nm dan menghitung presentase inhibisinya (Pogaga *et al.*, 2020).

g. Perhitungan Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan presentase perendaman serapan DPPH:

$$\% \text{Inhibasi} = \frac{(\text{Absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Setelah didapatkan data yang dibutuhkan, dilakukan perhitungan aktivitas antioksidan radikal bebas DPPH (%) yang dihitung dengan persamaan $y = bx + a$ dengan perbandingan antara presentase perendaman (y) dengan konsentrasi (x) dan kemudian ditentukan nilai IC_{50} yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 50 % radikal bebas.

Tabel 3.1 Parameter aktivitas antioksidan

Intensitas	Nilai IC_{50}
Sangat Kuat	<50 $\mu\text{g/ml}$
Kuat	50-100 $\mu\text{g/ml}$
Sedang	100-250 $\mu\text{g/ml}$
Lemah	250-500 $\mu\text{g/ml}$
Tidak Aktif	>500 $\mu\text{g/ml}$

(Sumber : Putri & Hidajati, 2015)

3.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak kulit batang mahoni analisis dengan menggunakan program SPSS 21 dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk menguji data terdistribusi secara normal atau tidak, dan uji homogenitas menggunakan *levene test* kemudian apabila data terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui

adanya perbedaan signifikan kedua sampel pada setiap uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit batang mahoni dengan vitamin C sebagai pembanding (Effendi, 2017).