

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

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

3.2 Instrumen Penelitian

3.2.1 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian adalah Biji Adas yang berasal dari tanaman *Foeniculum Vulgare Mill*, yang ditanam di daerah cepogo, Boyolali, Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan antara lain yaitu etanol 96% (Molindo Raya), DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) (Sigma Aldrich), aquadest (Shaguftan), vitamin C (Ika Pharmindo), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Kaitedo), Buffer asetat PH 3,6 (nitra medika), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck), TPTZ (Sigma), H_2SO_4 (Merck).

3.2.2 Alat

Labu ukur, gelas ukur, beaker glass, batang pengaduk, spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S), kuvet (Genesys 10S), neraca analitik (ACIS), corong (Pirex), pipet ukur (pirex), bal pipet, sendok tanduk, pipet volume (Pirex), kaca arloji (pirex), via (pirex), pipet tetes, mikro pipet (Amt-Y09), *water bath* (Memmert).

3.3 Variabel Penelitian

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

a. Variabel Terikat

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

b. Variabel Bebas

Variabel yang mempengaruhi atau menjadikan sebab dari perubahan atau timbulnya variabel terikat. Adapun variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol biji adas dan vitamin C sebagai pembanding

3.4 Definisi Operasional

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

a. Konsentrasi Ekstrak Etanol Biji Adas

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

b. *Inhibition Concentration 50% (IC₅₀)*

Inhibition Concentration 50% (IC₅₀) satuan $\mu\text{g/mL}$ merupakan nilai konsentrasi pada ekstrak etanol biji adas yang menghasilkan penangkapan 50% senyawa radikal.

3.5 Jalannya Penelitian

3.5.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman adas dilakukan di Balai Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu (B2P2TOOT).

3.5.2 Ekstraksi Biji Adas

Sebanyak 0,8 kg biji adas kering yang sudah di buat menjadi partikel kecil (serbuk) kemudian direndam dengan etanol 96% sebanyak 1 : 5 dalam maserator sambil diaduk-aduk setiap 1 jam lalu didiamkan selama 24 jam. Maserat yang sudah disaring dengan *corong buchner* kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* setealah itu di *waterbath* dengan suhu 60⁰C hingga dicapai konsistensi kental, selanjutnya dilakukan remaseras sebanyak 3 kali. Kemudian diperoleh ekstrak kental (Abdul, 2020).

3.5.3 Penentuan Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

a. Penyiapan sampel

Ekstrak etanol biji 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 cara ditimbang seksama DPPH 15,77 mg serbuk DPPH, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda pada labu takar 100,0 mL, dan disimpan dalam wadah gelap di almari es (Haryoto dkk., 2009)

c. Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan stok DPPH 0,4 mM sebanyak 1,0 mL ditempatkan dalam labu takar 5,0 mL selanjutnya ditambah etanol p.a sampai tanda batas kemudian, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450-545 nm terhadap belanko 5,0 mL etanol p.a, diplotkan harga absorbansi maksimum, pada penelitian ini diperoleh panjang gelombang maksimum λ 517 nm. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang dimana larutan cuplikan memiliki absorbansi maksimum (Haryoto dkk, 2009).

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 tanda batas 5,0 mL kemudian divorteks selama 30 detik dan di ukur pada panjang gelombang maksimum, diplotkan dengan nilai absorbansi dengan waktu ikubasi. Waktu inkubasi adalah waktu yang dibutuhkan dari awal hingga akhir untuk mendapatkan absorbansi yang stabil dan bereaksinya senyawa dengan preaksi (Haryoto dkk., 2009).

e. Penentuan total aktivitas antioksidan dalam sampel

Ekstrak biji adas dibuat lima seri konsentrasi dengan pengambilan 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, dan 400 µg/mL. Masing-masing ditambah 1,0 mL DPPH 0,4 mM dan etanol p.a hingga 5,0 mL. Campuran divortex 30 detik dan diinkubasi selama operating time (OT) waktu 30 menit. Absorbansi di ukur pada panjang gelombang maksimum terhadap blanko (etanol p.a). Dilakukan pula pengukuran absorbansi kontrol yang terdiri atas 1,0 mL DPPH dan etanol p.a 5,0 mL pada waktu tertentu

f. Analisis perhitungan IC₅₀

IC₅₀ adalah konsentrasi ekstrak biji adas yang memberikan % aktivitas antioksidan sebesar 50% (merendam 50% aktivitas dari DPPH) dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis regresi linier antara kadar terhadap persen penangkap radikal. Besarnya aktivitas penangkap radikal

menurut Sreenivasan dkk (2007) dalam Haryoto dkk (2009) dihitung dalam rumus :

$$(\%) \text{ perendaman} = \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\%$$

Nilai 50% *Inhibitory concentration* (IC₅₀) diperoleh dari persamaan regresi linier antara persen penangkap radikal sebagai Y dan konsentrasi ekstrak sebagai X. Nilai IC₅₀ sebagai indikasi terhadap besarnya aktivitas antioksidan kecilnya nilai IC₅₀ mengindikasikan aktivitas antioksidan yang besar (Haryoto dkk, 2009).

3.5.4 Penentuan aktivitas antioksidan dengan FRAP

a. Pembuatan Larutan (Samosir, 2012).

1) Buffer Asetat

Buffer asetat dengan pH 3,6 dibuat dari 0,775 gram natrium asetat trihidrat (CH₃COONa.3H₂O) yang ditambahkan dengan 4 mL asam asetat pekat dan dilarutkan dengan aquases hingga tepat 250 mL dalam labu takar.

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 µL HCl pekat dalam 100 mL aquades.

3) Larutan 20 mmol/L FeCl₃.6H₂O

Sebanyak 32,44 mg FeCl₃.6H₂O dilarutkan dengan buffer asetat dalam labu takar 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 FeCl₃.6H₂O, lalu ditambahkan aquades hingga tepat 100 mL dalam labu takar.

5) Pembuatan Larutan Standar FeSO₄.7H₂O

Larutan stock 1000 ppm FeSO₄.7H₂O dibuat dengan melarutkan 100 mg FeSO₄.7H₂O dalam 100 mL aquades. Selanjutnya dari larutan stock 1000 ppm FeSO₄.7H₂O dibuat seri konsentrasi 100 - 1000 µmol/L

b. Penentuan Penangkal Radikal Bebas (Samosir, 2012).**1) Penentuan panjang gelombang maksimum**

Panjang gelombang maksimum diperoleh melalui pengukuran absorbansi dari standar FeSO₄.7H₂O dengan konsentrasi stok 1000 ppm, dari larutan tersebut kemudian diambil sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan reagen FRAP sebanyak 3 mL, lalu dibaca pada setiap panjang gelombang dalam kisaran 588-598 nm dengan menggunakan spektrofotoneter UV-Vis. Diperoleh panjang

gelombang maksimum λ 595 nm dengan masa inkubasi operating time (OT) 30 menit.

2) Penentuan total aktivitas antioksidan dalam sampel

Ekstrak biji adas dibuat lima seri konsentrasi dengan pengambilan 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, dan 300 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing ditambah 3,0 mL reagen FRAP dan etanol p.a hingga 5,0 mL. Campuran divortex 30 detik dan diinkubasi selama operating time (OT) waktu 30 menit. Selanjutnya larutan siap untuk dibaca absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang maksimum (595 nm).

3) Analisis perhitungan 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 $\mu\text{M Fe}^{2+}$. Konsentrasi efektif IC_{50} dari nilai FRAP adalah konsentrasi sampel yang diperlukan untuk mengurangi 0,5 mol Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} (Karim dkk, 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 biji adas dengan menggunakan metode DPPH dan FRAP.