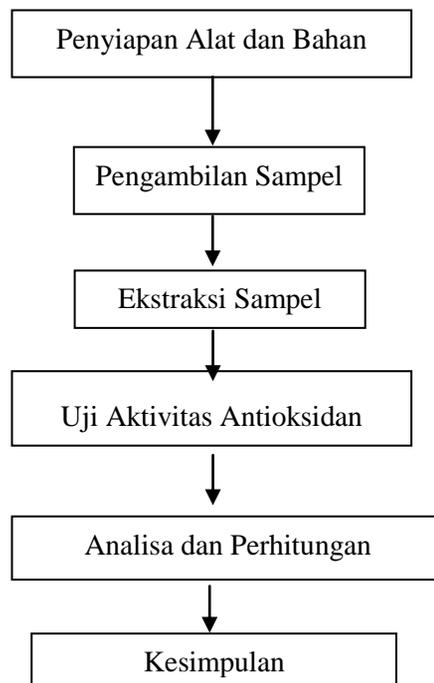


BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Pendekatan Penelitian

Jenis pendekatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen. Pelaksanaannya dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu tahap penyiapan sampel, ekstraksi serta uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kerangka penelitian untuk skripsi ini dapat dilihat pada diagram alir penelitian seperti pada Gambar 3.7



Gambar 3.7. Diagram Alir Penelitian

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di tiga tempat yang berbeda, yaitu:

1. Tempat pengambilan sampel dan preparasi sampel dilakukan di Desa Sruwen, Kecamatan Tengaran, Kabupaten Semarang
2. Tempat Penelitian untuk ekstraksi sampel dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang.
3. Tempat penelitian untuk uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Ilmu Tarbiyah dan Keguruan IAIN Walisongo Semarang

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai November 2014.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Neraca analitik
- b. Gelas ukur
- c. Tabung reaksi

- d. Gelas Beker
- e. Corong kaca
- f. Batang pengaduk
- g. Labu ukur
- h. Pemanas listrik
- i. Termometer
- j. Pipet ukur
- k. Blender
- l. Corong pemisah
- m. Vakum *rotary evaporator*
- n. Spektrofotometer UV-Vis.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Daun kangkung air (*Ipomoea aquatica* Forsk)
- b. Serbuk DPPH (1,1 –*diphenyl-2- picylhydrazyl*)
- c. Etil asetat teknis
- d. Metanol *p.a*

D. Metodologi Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah dengan metode DPPH. Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu:

1. Preparasi Sampel

- a. Sebanyak 1 kg daun kangkung air segar dibagi menjadi 4 bagian, masing-masing 250 gram diberi label K1, K2, K3 dan K4
- b. Sampel dengan label K1 dibiarkan saja tanpa diberi perlakuan pemanasan (tanpa dikukus), K2 dikukus selama 5 menit, K3 dikukus selama 10 menit dan K4 selama 15 menit, dengan suhu 100°C . Tabel 3.1 menunjukkan tabel perlakuan awal sampel kangkung air.

Tabel 3.1. Perlakuan awal sampel

No.	Kode Sampel	Lama Pengukusan
1.	K.1	0 menit
2.	K.2	5 menit
3.	K.3	10 menit
4.	K.4	15 menit

- c. Sampel dengan label K.1, K.2, K.3, dan K.4 didiamkan hingga kering pada suhu kamar di tempat yang tidak terkena cahaya matahari secara langsung
- d. Semua sampel menjadi kering sempurna setelah 7 hari
- e. Masing-masing sampel (K.1, K.2, K.3, K.4) yang sudah kering diblender tanpa pelarut
- f. Sebanyak 25 g daun kering yang sudah dihaluskan dari sampel K.1, K.2, K. Dan K.4, masing-masing dimaserasi menggunakan 250 ml etil asetat teknis selama 48 jam. Selama dimaserasi, dilakukan pengadukan beberapa kali
- g. Masing-masing sampel K.1, K.2, K.3 dan K.4 yang telah dimaserasi, disaring dan diambil filtratnya
- h. Filtrat dari K.1, K.2, K.3 dan K.4 yang telah disaring dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50⁰C

2. Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH pertama kali dijelaskan oleh Blois. Uji aktivitas antioksidan yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan prosedur Blois, yaitu absorbansi yang dihitung dari 1 ml sampel dicampur 1 ml DPPH dan diencerkan dengan 2 ml metanol.¹

a. Pembuatan larutan DPPH

Sebanyak 2 mg DPPH dilarutkan dalam 20 ml metanol sehingga diperoleh konsentrasi 100 µg/ml.

b. Optimasi panjang gelombang DPPH

Larutan DPPH dengan konsentrasi 100 µg/ml yang telah dibuat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510-525 nm ditentukan λ optimumnya, sehingga diperoleh λ_{mks} berada pada 515 nm

c. Pengujian absorbansi larutan blanko

- 1) Sebanyak 1 ml larutan DPPH 100 µg/ml dimasukkan dalam tabung reaksi
- 2) Ditambah 2 ml metanol
- 3) Dihomogenkan
- 4) Diinkubasi dalam penangas air 37⁰ C selama 30 menit
- 5) Diukur absorbansinya pada panjang gelombang optimum.

d. Pengujian ekstrak

- a) Sebanyak 25 mg dari ekstrak K.1, K.2, K.3 dan K.4 (Ekstrak etil asetat daun kangkung air) masing-masing dilarutkan dalam 25 ml metanol *p.a* sehingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/ml
- b) Dilakukan pengenceran sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml dan 100 µg/ml. Caranya dengan memipet larutan

¹ Molyneux, *The use of the stable free radical diphenyl picrylhy drazyl (DPPH),...*, hlm 213

induk berturut-turut sebanyak 0,25 ml; 0,5 ml; 0,75 ml ;1 ml, dimasukkan pada labu ukur 10 ml dan diencerkan dengan metanol *p.a* hingga tanda batas. Tabel 2 menunjukkan tabel pengenceran larutan induk dengan variasi konsentrasi 25, 50, 75 dan 100 ppm. Pengenceran larutan induk lebih rinci dapat dilihat pada Tabel 3.2

Tabel 3.2. Pengenceran larutan induk sampel

No	Konsentrasi	Larutan Induk Sampel			
		K.1	K.2	K.3	K.4
1.	25 ppm	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml
		Lar. induk	Lar. induk	Lar. induk	Lar. induk
		+	+	+	+
		9,75 ml	9,75 ml	9,75 ml	9,75 ml
		metanol	metanol	metanol	metanol
2.	50 ppm	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
		Lar. induk	Lar. induk	Lar. induk	Lar. induk
		+	+	+	+
		9,5 ml	9,5 ml	9,5 ml	9,5 ml
		metanol	metanol	metanol	metanol
3.	75 ppm	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml
		Lar. Induk	Lar. Induk	Lar. Induk	Lar. Induk
		+	+	+	+
		9,25 ml	9,25 ml	9,25 ml	9,25 ml
		metanol	metanol	metanol	metanol
4.	100 ppm	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
		Lar. Induk	Lar. Induk	Lar. Induk	Lar. Induk
		+	+	+	+
		9 ml	9 ml	9 ml	9 ml
		metanol	metanol	metanol	metanol

- c) Sebanyak 1 ml dari masing-masing konsentrasi larutan sampel K.1, K.2, K.3 dan K.4 dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 1 ml DPPH 100 $\mu\text{g/ml}$ dan diencerkan dengan 2 ml metanol *p.a* kemudian dihomogenkan
- d) Masing-masing larutan dalam tabung reaksi diinkubasi dalam penangas air 37⁰ C selama 30 menit
- e) Masing-masing sampel diukur absorbansinya satu per satu pada λ 515 nm

E. Teknik Analisa Data

Data hasil absorbansi masing-masing sampel digunakan untuk mencari % inhibisinya. Perhitungan yang digunakan adalah:

$$\% \text{ inhibisi} : \frac{A_{\text{Blanko}} - A_{\text{Sampel}}}{A_{\text{Blanko}}} \times 100\%$$

A_{blanko} = Absorbansi pada DPPH tanpa sampel

A_{Sampel} = Absorbansi pada DPPH setelah ditambah sampel

Hasil perhitungan persen (%) inhibisi disubstitusikan ke dalam persamaan linear $Y = aX + b$

Y = % Inhibisi a = Gradien

X = Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) b = Konstanta

Persamaan linear yang dihasilkan digunakan untuk memperoleh nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi yang diperoleh pada saat % inhibisi sebesar 50 dari persamaan $Y = aX + b$

Pada saat % Inhibisi = 50, maka untuk menghitung nilai IC_{50} persamaannya menjadi:

$$50 = aX + b$$

$$X = \frac{50 - b}{a} \text{ Harga } X \text{ adalah } IC_{50} \text{ dengan satuan } \mu\text{g/ml}$$