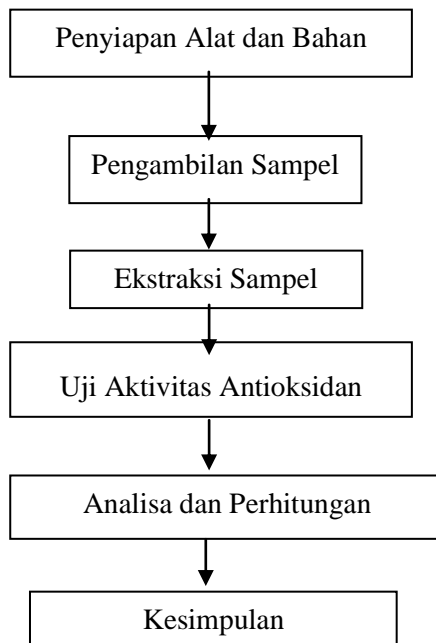


BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Pendekatan

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode kuantitatif dengan jenis pendekatan eksperimen laboratorium. Pelaksanaannya dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu tahap penyiapan sampel, ekstraksi serta uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Adapun kerangka penelitian untuk skripsi ini dapat dilihat pada diagram alir penelitian seperti pada Gambar 3.1



Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di tiga tempat yang berbeda, yaitu:

1. Tempat pengambilan sampel dan preparasi sampel dilakukan di desa Wilalung Gajah Demak
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 April sampai Mei 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. Oven

- l. Blender
 - m. Corong pemisah
 - n. Vakum *rotary evaporator*
 - o. Spektrofotometer UV-Vis.
2. Bahan
- Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:
- a. Daun salam (*Syzygium polyanthum*)
 - b. Daun jambu air (*Syzygium samarangense* (BL.) Merr.et Perry) var. delima
 - c. Serbuk DPPH (1,1 -*diphenyl-2- picylhydrazyl*)
 - d. Metanol teknis 95%
 - e. Metanol *p.a*
 - f. n-Heksana teknis 99%
 - g. Vitamin C

D. Metodologi Penelitian

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

1. Preparasi Sampel

- a. Daun salam dan daun jambu air diambil masing-masing 150 g daun segar
- b. Masing-masing diangin-anginkan hingga kering di tempat yang tidak terkena cahaya matahari secara langsung
- c. Daun salam dan daun jambu air menjadi kering setelah 7 hari

- d. Masing-masing daun kering diblender tanpa pelarut, daun kering yang dihasilkan masing-masing ± 100 gram
- e. 75 g serbuk kering daun salam dan 75 g serbuk kering daun jambu air, masing-masing dimaserasi dengan 500 mL n-heksana teknis selama 24 jam dan diulang sebanyak 2 kali dengan pelarut yang baru
- f. Selama dimaserasi dilakukan pengadukan beberapa kali
- g. Masing-masing disaring dan diambil filtratnya
- h. Residu masing-masing daun dikeringkan dengan dianginkan
- i. Residu daun salam dan daun jambu air dimaserasi lagi menggunakan 500 mL metanol teknis selama 24 jam dan diulang sebanyak 2 kali
- j. Selama dimaserasi dilakukan pengadukan beberapa kali
- k. Masing-masing disaring dan diambil filtratnya
- l. Masing masing filtrat metanol dan filtrat n-heksana dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50° C
- m. masing-masing filtrat metanol dan n-heksana dikentalkan dengan dioven pada suhu 50° C

2. Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH pertama kali dijelaskan oleh Blois dan prosedur kerjanya sudah banyak dimodifikasi oleh para peneliti lainnya. 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.^{1,2}

a. Pembuatan larutan DPPH

5 mg DPPH dilarutkan dalam 50 mL metanol sehingga diperoleh konsentrasi 100 µg/mL

b. Optimasi panjang gelombang DPPH

- 1) 1 mL larutan DPPH 100 µg/mL dimasukkan dalam tabung reaksi
- 2) Ditambah 3 mL metanol
- 3) Dihomogenkan
- 4) Diinkubasi dalam penangas air 37⁰ C selama 30 menit
- 5) ditentukan λ optimumnya, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510-525 nm
- 6) λ optimumnya berada pada panjang gelombang 515 nm

c. Pengujian ekstrak

- 1) Ekstrak n-heksana daun salam
 - a) 25 mg ekstrak n-heksana daun salam dilarutkan dalam 25 mL metanol *p.a* sehingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/mL

¹ Dewi Murni, Isolasi Uji Aktivitas Antioksidan,..., hlm.45 - 46

² Blois dalam Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH),..., hlm 213

- b) Dilakukan pengenceran sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$ dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Caranya dengan memipet larutan 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
 - c) 1 mL masing-masing konsentrasi larutan sampel (n-heksana daun salam) dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah 1 mL DPPH 100 $\mu\text{g/mL}$ dan diencerkan dengan 2 mL metanol *p.a*
 - d) Dihomogenkan
 - e) Diinkubasi dalam penangas air 37⁰ C selama 30 menit
 - f) Masing-masing diukur absorbansinya pada λ 515 nm
- 2) Ekstrak metanol daun salam
- a) 25 mg ekstrak metanol daun salam dilarutkan dalam 25 mL metanol *p.a* sehingga diperoleh konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$
 - b) Dilakukan pengenceran sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$ dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Caranya dengan memipet larutan 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
- c) 1 mL masing-masing konsentrasi larutan sampel (metanol daun salam) dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah 1 mL DPPH 100 µg/mL dan diencerkan dengan 2 mL metanol *p.a*
 - d) Dihomogenkan
 - e) Diinkubasi dalam penangas air 37⁰ C selama 30 menit
 - f) Masing-masing diukur absorbansinya pada λ 515 nm
- 3) Ekstrak n-heksana daun jambu air
- a) 25 mg ekstrak n-heksana daun jambu air 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 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
 - c) 1 mL masing-masing konsentrasi larutan sampel (n-heksana daun jambu air) dimasukkan dalam

- tabung reaksi dan ditambah 1 mL DPPH 100 $\mu\text{g/mL}$ dan diencerkan dengan 2 mL metanol *p.a*
- d) Dihomogenkan
 - e) Diinkubasi dalam penangas air 37⁰ C selama 30 menit
 - f) Masing-masing diukur absorbansinya pada λ 515 nm
- 4) Ekstrak metanol daun jambu air
- a) 25 mg ekstrak metanol daun jambu air dilarutkan dalam 25 mL metanol *p.a* sehingga diperoleh konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$
 - b) Dilakukan pengenceran sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$ dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Caranya dengan memipet larutan 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
 - c) 1 mL masing-masing konsentrasi larutan sampel (metanol daun jambu air) dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah 1 mL DPPH 100 $\mu\text{g/mL}$ dan diencerkan dengan 2 mL metanol *p.a*
 - d) Dihomogenkan
 - e) Diinkubasi dalam penangas air 37⁰ C selama 30 menit

- f) Masing-masing diukur absorbansinya pada λ 515 nm

d. Pengujian larutan pembanding

- 1) 25 mg vitamin C dilarutkan dalam 25 mL metanol *p.a* sehingga diperoleh konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$
- 2) Dilakukan pengenceran sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$ dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Caranya dengan memipet larutan 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
- 3) 1 mL masing-masing konsentrasi larutan sampel (vitamin C) dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah 1 mL DPPH 100 $\mu\text{g/mL}$ dan diencerkan dengan 2 mL metanol *p.a*
- 4) Dihomogenkan
- 5) Diinkubasi dalam penangas air 37⁰ C selama 30 menit
- 6) Masing-masing diukur absorbansinya pada λ 515 nm.^{3,4}

³ Dewi Murni, Isolasi Uji Aktivitas Antioksidan,..., hlm.45 - 46

⁴ Blois dalam Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH),..., hlm 213

E. Teknik Analisa Data

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

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

A_{Blanko} = Absorbansi pada DPPH tanpa sampel

A_{Sampel} = Absorbansi pada DPPH setelah ditambah sampel

Hasil perhitungan dimasukkan dalam persamaan linier dengan persamaan $Y = aX + b$

Y = Persentase Inhibisi

A = Gradien

X = Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)

b = Konstanta

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

Pada saat persentase inhibisi = 50, maka untuk menghitung nilai IC_{50} persamaannya menjadi:⁵

$$50 = aX + b$$

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

Semua data kuantitatif dianalisis secara statistik menggunakan analisis variansi (ANOVA) satu arah dengan taraf kepercayaan 95%. Data IC_{50} dihitung menggunakan analisis probit. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program SPSS.

⁵ Dewi Murni, Isolasi Uji Aktivitas Antioksidan, ..., hlm.46 - 47