

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental murni, dimana metode yang digunakan adalah metode kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui kandungan flavonoid dari daun kelor dan metode kuantitatif yang bertujuan melihat nilai IC₅₀ untuk mengetahui potensi antioksidan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dari dua daerah berbeda.

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro, Semarang Jawa Tengah.
2. Penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Instrumen Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo Semarang Jawa Tengah.

C. Subjek Penelitian

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kelor yang berasal dari dua daerah berbeda yaitu dari daerah sekitar Ungaran dan daerah Nusa Tenggara Timur. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dari daun kelor.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini meliputi :

1. Metode Ekstraksi Sokletasi

Metode ekstraksi sokletasi merupakan metode ekstraksi cara panas, cara melakukan metode ini yaitu sampel ditempatkan dalam kertas saring yang kemudian dimasukkan dalam klonsong ditempatkan diatas labu dan dibawah kondensor. Pelarut yang digunakan yaitu pelarut etanol 96%.

2. Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.)

Ekstrak daun kelor adalah ekstrak yang didapatkan dari proses sokletasi dengan pelarut etanol 96% kemudian dilanjutkan pada proses evaporasi menggunakan evaporator.

3. Aktivitas Antioksidan

Pada penelitian ini, uji aktivitas antioksidan adalah uji yang akan dilakukan dengan sampel ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) terhadap DPPH dengan hasilnya terjadi perubahan warna DPPH yang merupakan hasil peredaman radikal bebas.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil ekstraksi simplisia daun kelor dari dua daerah berbeda.

2. Variabel terikat

Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan ekstrak daun kelor dalam menangkal radikal bebas.

3. Variabel terkendali.

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah suhu soklet, konsentrasi ekstrak, sirkulasi soklet, panjang gelombang dan *operating time*.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan untuk ekstraksi dalam penelitian ini adalah alat sokletasi, labu ukur, pipet, kertas saring, kain flannel, batang pengaduk, *rotary evaporator*, waterbath, spektrofotometer UV – sinar tampak (*Genesys 10 vis Serises*), blender, ayakan mesh no.40, timbangan analitik (Mettler Toledo 2.0.0), pipet volume, rak dan tabung reaksi, cawan porselen dan gelas ukur, vial

b. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia kering daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) yang berasal dari sekitar wilayah Ungaran, Kabupaten Semarang dan sekitar wilayah Sumba Barat, Nusa Tenggara Timur; etanol 96%, etanol pa, serbuk DPPH, serbuk vitamin C, aquadest, serbuk magnesium, HCl 2%, larutan besi (III) klorida 2 N, kalium dikromat dan H₂SO₄ pekat.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang. Tujuan dilakukannya determinasi tanaman adalah untuk mengetahui kebenaran dan keaslian dari tumbuhan

daun kelor dengan tujuan untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan utama penelitian.

3. Pembuatan Simplisia Daun Kelor

Tanaman kelor (*Moringa oleifera* Lam.) diambil daun yang berwarna hijau tua dan tanpa cacat pada daunnya lalu disortasi basah untuk dipisahkan dari benda-benda asing atau kotoran-kotoran, kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir sampai benar-benar bersih. Kemudian daun dikeringkan dengan cara dikering-anginkan atau diangin-anginkan dalam suhu kamar sampai benar-benar kering. Setelah kering daun kelor di uji kadar airnya dengan menggunakan alat pengecek kadar air. Jika hasil pengujian kadar air simplisia $< 9\%$ maka daun kelor dihaluskan hingga menjadi serbuk dengan cara dihancurkan menggunakan blender, lalu kemudian diayak menggunakan mesh no.40 dengan cairan pelarut semakin luas (Habiba *et al.*,2022).

4. Pembuatan Ekstrak Daun Kelor

a. Ekstraksi dengan Metode Sokletasi

Rangkai dan pasang alat soklet kemudian ditimbang serbuk simplisia daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dari masing-masing daerah sebanyak 150 gram dibungkus menggunakan kertas saring, lalu masukkan ke dalam alat soklet. Masukkan pelarut etanol 96% sebanyak 800 mL, lakukan ekstraksi sokletasi dengan suhu 50°C hingga daun kelor tidak berwarna lagi (Husnah *et al.*,2019)

Setelah proses ekstraksi sokletasi selesai filtrat kemudian disaring menggunakan kertas saring. Berikutnya filtrat yang didapat diuapkan. Fungsi dari penguapan ini agar mendapatkan ekstrak kental pada sampel tersebut. Penguapan sampel hasil ekstraksi sokletasi menggunakan *rotary evaporator* pada kecepatan 50 rpm dan suhu 50°C dan dilanjutkan dengan waterbath hingga diperoleh berat yang konstan.

b. Penentuan Rendemen Ekstrak

Ekstrak yang didapat dari masing-masing daerah di hitung rendemen ekstraknya. Rendemen adalah hasil bagi dari berat ekstrak (produk) yang didapat dibagi dengan berat bahan baku dikalikan dengan 100% (Chairunnisa *et al.*,2019). Perhitungan nilai rendemen ekstrak didapat dari rumus :

$$\%Rendemen = \frac{\text{Berat Ekstrak Berupa pasta (gram)}}{\text{Berat Serbuk Simplisia Kering (gram)}} \times 100\%$$

c. Uji Bebas Etanol.

Pengujian ini dilakukan dengan cara memasukkan sebanyak 1 ml ekstrak dari masing-masing daerah ke tabung reaksi yang telah diberi label sesuai daerah asal ekstrak, kemudian ditambahkan 2 tetes H₂SO₄ pekat dan 1 ml K₂Cr₂O₇ (Kalium Dikromat). Ekstrak dikatakan bebas etanol jika tidak ada bau ester yang khas dari pelarut etanol (Tivani *et al.*,2021).

5. Skrining Fitokimia

a. Uji flavonoid

Adanya flavonoid dilakukan dengan cara ekstrak dari masing-masing daerah diambil sepucuk spatula lalu ditambahkan sepucuk serbuk Mg dan empat tetes HCl 2%. Adanya hasil positif uji flavonoid ditandai dengan terjadinya perubahan warna filtrat menjadi jingga-merah. (Meigaria *et al.*,2016)

b. Uji saponin

Sejumlah ekstrak dari masing-masing daerah diambil dan dilarutkan menggunakan aquades lalu dipanaskan selama 15 menit kemudian dikocok selama 10 detik. Jika terbentuk buih atau busa yang stabil selama 10 menit tambahkan beberapa tetes asam klorida 2 N maka sampel tersebut mengandung Saponin (Meigaria *et al.*,2016)

c. Uji tanin

Ekstrak dikatakan mengandung tanin jika hasil pengujian menunjukkan perubahan warna biru tua atau kehitaman. Ekstrak dari masing-masing daerah diambil sebanyak 1 ml lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan beberapa tetes larutan besi (III) Klorida 1% (Meigaria *et al.*,2016)

6. Pengujian Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan Larutan DPPH 0.5 mM

Larutan DPPH 0,5 mM (40 ppm) dalam pelarut etanol pa, pembuatan larutan ini adalah dengan cara menimbang 4 mg serbuk DPPH lalu masukkan serbuk tersebut kedalam labu ukur 100 mL ditambah dengan etanol pa sebagian kemudian dikocok untuk melarutkan serbuk DPPH lalu terakhir tambahkan etanol pa hingga tanda batas (Riskianto *et al.*,2021)

b. Penentuan Panjang gelombang maksimum

Larutan DPPH 0,5 mM diambil sebanyak 1 mL ditambahkan 4 ml etanol pa dikocok hingga homogen atau terampur rata lalu diukur serapannya yang didapatkan pada rentang 510-520 nm dengan menggunakan blanko etanol pa (Yuliani dan Dienina, 2015). Untuk mendapatkan nilai absorbansinya maka diukur pada panjang gelombang 515 nm (Retnaningtyas *et al.*,2017)

c. Penentuan Operating Time

Penentuan *operating time* dilakukan dengan memipet larutan larutan DPPH sebanyak 1 ml tambahkan 4 ml etanol pa kocok hingga homogen. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 30 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Sukmawati *et al.*,2018)

d. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kelor dari Dua Daerah Berbeda

Ekstrak kental daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dari masing-masing daerah yang telah diekstraksi menggunakan metode

ekstraksi sokletasi diambil sebanyak 25 mg ditimbang dan dilarutkan dalam etanol pa kemudian dicukupkan volumenya hingga 25 ml (1000 ppm). Lalu dibuat seri konsentrasi ekstrak kental daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm dan 400 ppm dan 500 ppm (Riskianto *et al.*,2021)

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan memipet 0,5 mL larutan sampel ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dari berbagai konsentrasi. Lalu masing-masing larutan ditambahkan 3,5 mL DPPH 0,5 mM. Larutan kemudian dihomogenkan dan diinkubasi sesuai dengan waktu operating time dilakukan didalam ruangan gelap dan serapannya diukur pada panjang gelombang maksimal yang didapatkan serta dilakukan replikasi sebanyak tiga kali replikasi. (Riskianto *et al.*,2021)

e. Pembuatan larutan pembanding vitamin C

Sebanyak 25 mg vitamin C ditambahkan aquades secukupnya, kemudian volume akhir dicukupkan dengan aquades hingga 25 mL (1000 ppm). Lalu dari larutan tersebut dibuat seri konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm.

Untuk melihat kadar aktivitas antioksidan dari larutan pembanding dilakukan dengan memipet 0,5 mL larutan sampel pembanding vitamin C dari berbagai konsentrasi. Lalu masing-masing larutan ditambahkan 3,5 ml DPPH 0,5 mM. Larutan kemudian dihomogenkan dan diinkubasi sesuai waktu operating time dilakukan

didalam ruangan gelap dan serapannya diukur pada panjang gelombang maksimal yang didapatkan (Riskianto *et al.*, 2021)

G. Analisis Data

1. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus :

$$\%Rendemen = \frac{\text{Berat Ekstrak Berupa pasta (gram)}}{\text{Berat Serbuk Simplisia Kering (gram)}} \times 100\%$$

2. Peredaman Radikal Bebas

Besarnya persentase dari peredaman radikal bebas dari sampel terhadap DPPH dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ pengikatan radikal bebas} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

3. Nilai IC₅₀

Setelah didapat nilai peredaman radikal bebas dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linear (x,y) dimana perhitungan ini dilakukan untuk mendapatkan nilai IC₅₀, dimana sumbu x sebagai konsentrasi sampel (ppm) dan % inhibisi sebagai sumbu y. Nilai IC₅₀ berfungsi untuk menunjukkan konsentrasi yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. IC₅₀ Ekstrak etanol daun kelor dan vitamin C diperoleh dengan rumus (Riskianto *et al.*,2021) :

$$IC_{50} = \frac{(50 - a)}{b}$$

4. Uji Statistika

Data pada penelitian ini dianalisis secara deskriptif. Analisis dilakukan secara statistik menggunakan metode analisis varian satu jalan

Uji One Way ANOVA, SPSS versi 26 dengan taraf kepercayaan 95% (Lestari *et al.*,2020).

a. Uji Normalitas

Uji normalitas menggunakan uji normalitas One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test. Sebelum dilakukan uji statistik harus dilakukan uji normalitas terlebih dahulu untuk memastikan data terdistribusi normal ($P > 0,05$) (Hidayati, 2021). Uji normalitas ini bertujuan untuk menguji apakah dalam model regresi, variable pengganggu atau residual memiliki data yang terdistribusi normal atau tidak (Siregar, 2015). Pengambilan kesimpulan dari uji normalitas dapat dilihat berdasarkan:

- 1) Jika nilai singnifikansi yang diperoleh $> 0,05$ maka data dinyatakan terdistribusi normal.
- 2) Jika nilai signifikansi $< 0,05$ maka data dinyatakan tidak terdistribusi normal.

b. Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan untuk mengetahui ada beberapa varian populasi yang digunakan adalah sama atau tidak. Uji homogenitas dilakukan sebagai salah satu prasyarat dalam uji Anova. Asumsi yang menjadi dasar dalam analisis varian (Anova) adalah bahwa varian dari populasi adalah sama. Uji kesamaan antara dua varians digunakan untuk menguji apakah sebaran dari data tersebut termasuk homogen atau tidak, dengan cara membandingkan kedua

variannya. Jika dari kedua kelompok data atau lebih memiliki varians yang sama besar maka uji homogenitas tidak perlu dilakukan lagi karena data yang didapatkan sudah dianggap homogen. Uji homogenitas dilakukan apabila data kelompok data tersebut terdistribusi normal.

c. Uji *Post-Hoc* LSD (*Least Significant Different*)

Uji LSD (*Least Significant Different*) merupakan suatu prosedur lanjutan yang bertujuan untuk mengetahui perlakuan mana saja yang berbeda secara signifikan apabila hipotesis nol ditolak (Montgomery, 2011)