

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium untuk memperoleh data hasil berupa nilai IC_{50} sebagai pengukur aktivitas antioksidan. Metode uji FRAP berdasarkan pada daya reduksi yang merupakan indikator potensi dari senyawa antioksidan. Metode uji DPPH berdasarkan pada daya peredaman atau inhibisi dari larutan DPPH yang berwarna oleh senyawa antioksidan.

B. LOKASI PENELITIAN

Lokasi penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu:

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan ekstrak etanol buah bit dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
3. Uji aktivitas antioksidan metode FRAP dan DPPH dilakukan di Laboratorium Instrument Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. DEFINISI OPERASIONAL

Tabel 2 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil	Skala Data
Ekstrak buah bit	Pembuatan ekstrak buah bit dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%	-	-	-
Sari buah bit	Sari diperoleh dengan <i>juicer</i> tanpa dilakukan penambahan air	-	-	-
Nilai IC ₅₀	IC ₅₀ digunakan sebagai parameter untuk menentukan konsentrasi senyawa antioksidan yang mampu menghambat sebesar 50% oksidasi.	Metode FRAP dan DPPH menggunakan Spektrofotometri Uv Vis	Nilai IC ₅₀	Ordinal

D. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel bebas

Konsentrasi ekstrak dan sari buah bit pada metode FRAP yaitu 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Konsentrasi ekstrak dan sari buah bit pada metode DPPH yaitu 6, 9, 12, 15, dan 18 ppm.

2. Variabel terikat

Nilai IC₅₀ hasil uji antioksidan dengan metode FRAP dan DPPH.

3. Variabel terkontrol

Tanaman budidaya, suhu pengeringan, kondisi tempat pengeringan, metode pembuatan ekstrak buah bit, pembuatan sari buah bit, kontrol pembandingan (vitamin C), dan metode pengujian antioksidan.

E. ALAT DAN BAHAN

1. Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah :

Juicer (Vaganza), pisau, nampan, kain hitam, blender, ayakan, timbangan analitik (Ohaus), toples kaca, beaker glass (Pyrex), kertas saring, corong kaca, sendok pengaduk kaca, cawan penguap, labu ukur (Pyrex, Iwaki), pipet ukur, *rotary evaporator* (RE 100-Pro), *waterbath* (Memmert), labu alas bulat (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), rak tabung reaksi, mikropipet (BioHit 1000 μ L), vial, inkubator, kuvet, pH meter (Ohaus), sentrifuge (Gemmy PLC 05), tabung sentrifuge, vortex, dan spektrofotometer UV Vis (Shimadzu UV Mini 1800).

2. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah :

Buah bit, etanol teknis 96% (Brataco), vitamin C (Merck), aluminium foil, asam asetat glasial, asam sulfat pekat, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Aldrich), etanol pro analisis (Brataco), asam oksalat ($C_2H_2O_4$), trikloroasetat (TCA), Besi Klorida ($FeCl_3$), NaOH, buffer fosfat, Kalium Ferrisianida 1 % ($K_3Fe(CN)_6$), dan akuades (CV. Bratachem).

F. PENGUMPULAN DATA

1. Determinasi Buah Bit (*Beta vulgaris* L.)

Tanaman buah bit (*Beta vulgaris* L.) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Desa Kopeng, Kecamatan Getasan, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah dan dideterminasi di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro Semarang untuk membuktikan identitasnya.

2. Pembuatan sari buah bit

Buah bit yang digunakan untuk dibuat sari buah menggunakan buah dengan kondisi segar dan sudah matang. Pembuatan sari buah menggunakan alat *juicer* tanpa dilakukan penambahan air. Pembuatan sari dilakukan sesaat sebelum dilakukan uji kandungan antioksidan untuk mencegah terjadinya oksidasi.

3. Pembuatan simplisia dan serbuk buah bit

Tahapan membuat simplisia yang pertama adalah pengumpulan buah bit. Selanjutnya dilakukan sortasi basah dan dilakukan pengupasan untuk memisahkan pengotor organik dan anorganik, lalu dilakukan pencucian, pengirisan tipis, pengeringan, sortasi kering untuk menghilangkan pengotor, serta pengemasan. Buah bit dipilih yang masih segar dan tidak memiliki banyak bopeng. Buah bit dipisahkan dari batangnya, dikupas, dicuci hingga bersih sampai tidak ada kotoran, selanjutnya dikering anginkan hingga tidak terasa basah,

dan dilakukan pemotongan menjadi tipis-tipis dengan ukuran 2-3 mm. Pengeringan dilakukan dengan panas matahari selama 7 hari dengan waktu 8 jam setiap harinya. Simplisia yang sudah kering sempurna disortasi kering. Simplisia kemudian diblender untuk membuat serbuk, dan diayak dengan mesh nomor 40 selanjutnya siap dilakukan ekstraksi.

4. Pembuatan ekstrak etanol 96% buah bit

Serbuk buah bit yang sudah dibuat direndam dalam toples kaca dengan pelarut etanol 96% menggunakan perbandingan 1 : 5 % b/v (Handoyo, 2020). Sebanyak 200 gram sampel direndam ke dalam pelarut etanol 96% sebanyak 1 L sampai seluruh bahan terendam. Maserasi dilakukan dalam wadah kaca dan dilakukan pada lokasi yang terhindar dari cahaya selama 5 hari sambil diaduk setiap 6 jam. Maserat yang diperoleh dipisahkan menggunakan kertas saring kemudian dihilangkan pelarutnya menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 70°C dan pelarutnya diuapkan dengan *water bath* hingga diperoleh ekstrak kental.

5. Pemeriksaan simplisia dan ekstrak

Pemeriksaan yang dilakukan meliputi pemeriksaan:

a. Kadar air

Kadar air simplisia dan ekstrak penetapannya dilakukan dengan metode gravimetri. Simplisia buah bit ditimbang 1,03 g dan ekstrak sebanyak 1,14 g kemudian dimasukkan dalam cawan

porselin yang telah ditara. Simplisia dan ekstrak dimasukkan dalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam, dan dilakukan penimbangan (Depkes RI, 2017).

b. Kadar abu total

Simplisia ditimbang sebanyak 2 g dan ekstrak ditimbang sebanyak 2,33 g. simplisia dan ekstrak dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijar dan ditara, simplisia dan ekstrak dipijarkan selama 3 jam dengan suhu $600 \pm 25^{\circ}\text{C}$, kemudian dilakukan pendinginan dan dilakukan penimbangan. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Y. P. Utami et al., 2017).

c. Uji Bebas etanol

Ekstrak kental yang telah dibuat dilakukan uji bebas etanol. Reaksi identifikasi uji bebas etanol yaitu menggunakan pereaksi asam asetat dan menggunakan katalis asam sulfat pekat. Langkah pertama yaitu, 1 g ekstrak dimasukan ke dalam tabung reaksi, kemudian 2 tetes asam sulfat pekat dan 2 tetes asam asetat ditambahkan, kemudian dipanaskan dalam gelas beker yang berisi air di atas *hot plate*. Ekstrak dikatakan bebas dari pelarut apabila hasil dari reaksi tersebut tidak tercium bau etil asetat (Tenda et al., 2017).

6. Skrining Fitokimia

a. Alkaloid

Sampel ekstrak ditimbang sebanyak 500 mg, ditambahkan 1 mL HCl 2 N dan 9 mL akuades dalam tabung reaksi, dipanaskan dalam gelas beker di atas *hot plate* selama 2 menit, ditunggu hingga dingin kemudian disaring. Filtrat tersebut dibagi menjadi 2, masing-masing 1 mL filtrat dalam tabung reaksi. 2 tetes dragendorff diteteskan pada tabung pertama kemudian tabung kedua ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer (Jawa *et al.*, 2020).

b. Flavonoid

Ekstrak kental ditimbang sebanyak 500 mg, dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas beker, dipanaskan 5 menit di atas *hot plate* kemudian disaring. Filtrat sebanyak 3 mL dimasukkan tabung reaksi dan ditambahkan 1 mg serbuk Mg dan 1 mL larutan alkohol klorhidrat (campuran HCl 37% dan etanol 95% dengan volume sama), kemudian ditambahkan 3 tetes amil alkohol, dikocok dengan kuat, dan dibiarkan memisah (Jawa *et al.*, 2020).

c. Saponin

Ekstrak kental diambil sebanyak 1 g dan ditambahkan 10 mL akuades. Larutan uji dimasukan dalam tabung reaksi dikocok dengan kuat selama 10 detik. Positif mengandung saponin apabila

terbentuk busa stabil selama 10 menit, setinggi 1-10 cm (*Jawa et al.*, 2020).

d. Tanin

Ekstrak kental diambil sebanyak 0,5 g dan dilarutkan dengan 5 mL akuades. kemudian ditambahkan 3 tetes FeCl_3 . Adanya senyawa tanin ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi hijau kehitaman (*Jawa et al.*, 2020).

e. Triterpenoid dan steroid

Ekstrak kental diambil 0,5 g dan dimasukkan tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1 mL kloroform, 1 mL CH_3COH anhidrat, dan 1 mL H_2SO_4 untuk uji triterpenoid. Ekstrak kental diambil 0,5 g, ditambahkan 1 mL kloroform, 1 mL CH_3COH anhidrat, dan 1 mL H_2SO_4 melalui dinding tabung reaksi untuk uji steroid. Hasil positif steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru atau hijau dan membentuk cincin. Hasil positif triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna merah atau ungu (*Jawa et al.*, 2020).

f. Fenol

Ekstrak kental diambil sebanyak 0,5 g dan ditambahkan 5 mL amoniak serta 25 mL kloroform kemudian dihomogenkan. Campuran disaring, dan 5 mL filtrat ditambahkan dengan 3 tetes larutan FeCl_3 . Terbentuknya warna hijau-biru-hitam hingga hitam menunjukkan adanya senyawa fenol (*Riskianto et al.*, 2022).

7. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode FRAP

a. Air Bebas CO₂

Akuades diambil sebanyak 500 mL, dipanaskan, dan dibiarkan mendidih selama 5 menit, kemudian ditutup dengan aluminium foil. Hubungan dengan udara dicegah semaksimal mungkin, kemudian didinginkan tanpa membuka penutup.

b. Larutan Dapar Fosfat pH 6,6

NaOH 0,4 g ditimbang dan dilarutkan menggunakan akuades bebas CO₂ hingga 50 mL dalam labu ukur. Kemudian 2,72 g KH₂PO₄ dilarutkan dengan akuades hingga 100 mL dalam labu takar. Sebanyak 8,2 mL NaOH dimasukkan dalam labu ukur dan dicampur dengan 25 mL KH₂PO₄, diukur dengan pH meter sampai pH 6,6 dan dicukupkan dengan akuades hingga 100 mL (Maryam *et al.*, 2016).

c. Larutan oksalat 1 %

Larutan oksalat 1 % dibuat dengan 1 g asam oksalat (C₂H₂O₄) dilarutkan dengan akuades bebas CO₂ dalam labu takar 100 mL.

d. Larutan FeCl₃ 0,1 %

Larutan FeCl₃ 0,1 % dibuat dengan melarutkan 50 mg FeCl₃ dalam akuades dan diencerkan dalam labu takar 50 mL.

e. Larutan Kalium Ferrisianida 1 %

Larutan Kalium Ferrisianida 1 % dibuat dengan 0,5 g kalium ferrisianida ($K_3Fe(CN)_6$) dilarutkan dengan akuades dalam labu takar 50 mL.

f. Larutan asam trikloroasetat (TCA) 10 %

Larutan asam trikloroasetat 10 % dibuat dengan melarutkan 2,5 g TCA dengan akuades hingga 25 mL dalam labu takar 25 mL.

g. Penentuan panjang gelombang maksimal

Panjang gelombang maksimal ditentukan dengan larutan standar vitamin C konsentrasi 70 ppm yang dilakukan pengukuran absorbansinya. 1 mL larutan vitamin C 70 ppm dicampur 1 mL dapar fosfat dan 1 mL kalium ferrisianida 1 %, kemudian diinkubasi pada suhu $50^\circ C$ selama 20 menit. Larutan ditambahkan 1 mL TCA, lalu disentrifugasi dengan 3000 rpm selama 10 menit. Kemudian dimasukkan dalam labu takar 10 mL, ditambahkan 1 mL akuades dan 0,5 mL $FeCl_3$, serta ditambah asam oksalat hingga tanda batas, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 500-800 hingga diperoleh λ maksimal (Rahayu *et al.*, 2021).

h. Penentuan *operating time*

Panjang gelombang maksimal yang telah didapatkan kemudian dilanjutkan dengan penetapan *operating time* untuk

menentukan waktu reaksi larutan paling stabil dan dibaca absorbansinya pada menit ke 1 sampai ke 30.

i. Pembuatan Baku Perbandingan

Larutan stok vitamin C 100 ppm diambil 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mL dan masing-masing dimasukkan labu ukur 5 mL yang berbeda dan dilarutkan dengan akuades hingga tanda batas. Masing-masing konsentrasi dipipet 1 mL dalam labu 10 mL ditambahkan 1 mL dapar fosfat, 1 mL $K_3Fe(CN)_6$, 1 mL akuades, 0,5 mL $FeCl_3$ 0,1 %, serta ditambahkan asam oksalat hingga tanda batas, setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal 681,4 nm.

j. Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak dan sari buah bit

Ekstrak buah bit diambil sebanyak 25 mg dilarutkan dengan 25 mL etanol p.a pada labu takar 25 mL hingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dipipet 20 μ L, 40 μ L, 60 μ L, 80 μ L, dan 100 μ L larutan stok ke dalam tabung reaksi. Larutan sari buah bit diambil sebanyak 2,5 mL dan dilarutkan dalam 25 mL akuades pada labu takar 25 mL hingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Kemudian dipipet 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 mL ke dalam tabung reaksi.

Langkah selanjutnya ditambahkan masing-masing 1 mL dapar fosfat (pH 6,6) dan 1 mL $K_3Fe(CN)_6$ 1 %. Larutan ditambahkan 1 mL larutan TCA 10 % lalu disentrifugasi dengan

kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifugasi, dipipet, dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, dan ditambahkan 0,5 mL FeCl₃ 0,1 % dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Lalu diukur serapan dengan panjang gelombang maksimalnya (Rahayu *et al.*, 2021).

8. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH 20 ppm

DPPH sejumlah 10 mg ditimbang kemudian dilarutkan dengan 100 mL etanol p.a. dalam labu ukur 100 mL hingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan induk diambil 20 mL kemudian dilarutkan dalam labu ukur 100 mL sehingga didapatkan larutan DPPH 20 ppm (Darwis *et al.*, 2018).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal dan *Operating Time*

Larutan DPPH 20 ppm sebanyak 3,8 mL dipipet dan ditambahkan dengan 0,2 mL akuades. Setelah dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap, serapan diukur dengan spektrofotometer UV- Vis pada panjang gelombang 400-600 nm dan dilanjutkan pengujian *operating time* pada menit ke-1 hingga menit ke-30 (Darwis *et al.*, 2018).

c. Pengukuran Serapan Larutan Blanko DPPH

Larutan DPPH 20 ppm dipipet 3,8 mL dan ditambahkan dengan 0,2 mL akuades. Kemudian diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 516,8 nm.

d. Pembuatan Kontrol Pembanding Vitamin C

Larutan vitamin C dibuat dengan cara menimbang 10 mg vitamin C, dilarutkan dengan akuades, lalu dicukupkan volumenya hingga 100 mL sehingga larutan vitamin C memiliki konsentrasi 100 ppm. Selanjutnya dari larutan tersebut diencerkan menjadi larutan dengan konsentrasi 6 ppm, 9 ppm dan 12 ppm, 15 ppm, dan 18 ppm.

e. Pengukuran Daya Antioksidan Vitamin C

Vitamin C dengan berbagai konsentrasi yakni 6 ppm, 9 ppm dan 12 ppm, 15 ppm, dan 18 ppm masing-masing dipipet sebanyak 0,2 mL lalu ditambahkan 3,8 mL DPPH. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal 516,8 nm.

f. Pembuatan Larutan Sampel

Sampel sari segar diambil sebanyak 10 mL dan dihomogenkan dengan akuades hingga 100 mL dalam labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Diambil dan dihomogenkan larutan sebanyak 0,3; 0,45; 0,6; 0,75; dan 0,9 mL ke dalam labu ukur 5 mL sehingga didapat konsentrasi 6, 9, 12, 15, dan 18 ppm. Ekstrak kental diambil 25 mg kemudian dilarutkan dalam 25 mL etanol p.a. dalam labu ukur 25 mL sehingga didapat konsentrasi larutan 1000 ppm. Kemudian dipipet 30, 45, 60, 75, dan 90 μ L, dimasukkan dalam labu ukur 5 mL

dicukupkan dengan etanol p.a., didapatkan larutan uji seri konsentrasi 6, 9, 12, 15, dan 18 ppm.

g. Pengukuran Aktivitas Pengikatan DPPH

Masing-masing sampel yang sudah disiapkan dipipet 0,2 mL, kemudian ditambahkan 3,8 mL larutan pereaksi DPPH pada tabung reaksi. Campuran dihomogenkan kemudian absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal 516,8 nm.

G. PENGOLAHAN DATA

1. Metode FRAP

Perhitungan persen sisa Fe^{3+} didapatkan dengan rumus :

$$\text{Persen (\%)} \text{ sisa } \text{Fe}^{3+} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100 \%$$

Keterangan :

A_0 = absorbansi blanko (tidak mengandung senyawa uji/ekstrak)

A_1 = absorbansi sampel uji/senyawa pembanding.

Setelah didapatkan nilai persen sisa Fe^{3+} , selanjutnya dihitung nilai persen mereduksi dengan rumus :

$$\% \text{ mereduksi} = 100\% - \% \text{ sisa } \text{Fe}^{3+}$$

Hasil perhitungan dari aktivitas antioksidan dimasukkan kedalam persamaan garis :

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y = % mereduksi

a = Gradien

b = Konstanta

x = konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)

Setelah didapatkan presentase mereduksi dari masing-masing konsentrasi, selanjutnya dengan perhitungan secara regresi linier (x,y) untuk mendapatkan nilai IC_{50} dimana x sebagai konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) dan y sebagai presentase mereduksi (%).

2. Metode DPPH

Perhitungan persen inhibisi didapatkan dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100\%$$

Keterangan :

A_0 = Absorbansi blanko (tidak mengandung senyawa uji/ekstrak)

A_t = Absorbansi dengan adanya ekstrak

Data yang diperoleh dengan membuat persamaan garis yang menghubungkan antara % inhibisi terhadap konsentrasi larutan uji masing-masing sampel. IC_{50} diperoleh dengan masing-masing larutan uji yang bisa menghasilkan hambatan radikal bebas (% inhibisi) sebesar 50 % berdasarkan persamaan garis regresi linear menggunakan rumus :

$$Y = a + bX$$

Keterangan :

Y = Persen Inhibisi (%)

X = Konsentrasi (K)

H. ANALISIS DATA SECARA STATISTIK

Teknik analisis data dilakukan secara statistik menggunakan SPSS Statistik 21 untuk menentukan ada atau tidaknya perbedaan antara nilai IC_{50} pada sampel sari buah dan ekstrak etanol dengan kedua metode. Pertama dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk*. Pada uji

normalitas data dapat dikatakan terdistribusi normal apabila $\text{Sig} > \alpha 0,05$, sedangkan data dikatakan tidak terdistribusi normal apabila $\text{Sig} < \alpha 0,05$.

Uji varian data menggunakan uji F untuk mengetahui homogenitas data nilai IC_{50} . Data dikatakan homogen apabila $\text{Sig} > \alpha 0,05$, sedangkan data dikatakan tidak homogen apabila $\text{Sig} < \alpha 0,05$. Selanjutnya dianalisis dengan uji analisis *One Way ANOVA* untuk melihat perbedaan metode uji FRAP dan DPPH. Jika $\text{Sig.} < \alpha 0,05$ artinya data berbeda signifikan, sedangkan jika $\text{Sig.} > \alpha 0,05$ artinya data tidak berbeda signifikan. Analisis uji *Post Hoc LSD* digunakan untuk menentukan apakah suatu kelompok memiliki perbedaan yang signifikan dari kelompok lainnya. Hasil analisis uji *Post Hoc LSD* pada penelitian ini ditunjukkan dengan tanda bintang (*) yang menunjukkan bahwa setiap kelompok memiliki perbedaan secara signifikan terhadap kelompok lain.