

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Penelitian ini menggunakan metode DPPH dan maserasi. Penelitian ini dilakukan untuk melihat pelarut ekstraksi bunga brokoli memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda terhadap DPPH.

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi bunga brokoli (*Brassica oleracea var. italica*) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains Dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
2. Uji fitokimia dan pembuatan ekstrak bunga brokoli (*Brassica oleracea var. italica*) dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Definisi Operasional

1. Simplisia Bunga Brokoli

Simplisia bunga brokoli adalah simplisia yang diperoleh asal Desa Bandungan yang diproses pengeringan dengan matahari langsung yang ditutupi kain berwarna hitam.

2. Ekstrak Bunga Brokoli

Ekstrak bunga brokoli diperoleh dari ekstraksi dengan maserasi serbuk simplisia bunga brokoli dalam etanol 96% dan aseton 95% yang

kemudian dilakukan pemekatan ekstrak menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* pada suhu 50°C.

3. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Sesuai dengan tujuan penelitian yang akan di capai, maka variabel yang akan di pelajari dalam penelitian ini adalah dengan perbedaan pelarut ekstraksi yang diperoleh dengan cara maserasi dengan etanol 96% dan aseton 95%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang di pengaruhi akibat dari adanya variabel bebas yaitu aktivitas antioksidan ekstrak bunga brokoli. Variabel terikat dalam penelitian ini diukur dengan dpph (Sugiyono, 2013).

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah waktu dan suhu ekstraksi, asal dari sampel yaitu Desa Bandungan.

E. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Peralatan yang di gunakan pada penelitian kali ini adalah pipet, batang pengaduk, spatula, gelas ukur, tabung reaksi, penangas air, cawan porselen, toples kaca, rak dan tabung reaksi, timbangan analitik

(Mettler Toledo 2.0.0), labu ukur, spektrofotometer UV-sinar tampak (*Genesys 10 vis Series*), rotary evaporator.

b. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu etanol 96%, aseton 95%, DPPH, quercetin, etanol pa, ekstrak bunga brokoli (*Brassica oleracea var. italica*).

2. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang untuk mengetahui kebenaran dan keaslian dari tumbuhan brokoli dengan tujuan untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan utama penelitian.

3. Pembuatan Simplisia Bunga Brokoli

a. Pembuatan simplisia

Pembuatan simplisia diperoleh dari brokoli sebanyak 7 Kg. Kemudian brokoli tersebut dilakukan sortasi basah, brokoli yang telah disortasi dicuci dengan air mengalir. Brokoli yang telah dicuci kemudian dirajang untuk di ambil bunganya selanjutnya dikeringkan menggunakan bantuan sinar matahari dan ditutup menggunakan kain berwarna hitam. Hasil dari proses pengeringan ini kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan 60 mesh.

4. Pembuatan Ekstrak Bunga Brokoli

Pembuatan ekstrak dengan metode maserasi, simplisia brokoli ditimbang sebanyak 200 gram dengan etanol 96% dan aseton 95%. Simplisia kemudian di maserasi dengan 2000 mL etanol 96% dan 2000 mL aseton 95% selama 3 x 24 jam selanjutnya diremaserasi selama 2x24 jam. Ekstrak yang di peroleh kemudian di uapkan dan di pekatkan dengan rotary evaporator tekanan rendah pada suhu 50°C, hingga didapat ekstrak kental.

5. Penetapan Parameter Standarisasi

a. Parameter spesifik

1) Pemeriksaan organoleptik

Pemeriksaan organoleptic memberikan pengenalan awal serbuk simplisia dan ekstrak brokoli secara objektif berupa warna, bentuk dan bau.

2) Uji Fitokimia

a) Identifikasi golongan flavonoid

Uji flavonoid, timbang sebanyak 0,5 ml masing-masing ekstrak lalu tambahkan serbuk magnesium sebanyak 2 mg dan beri 3 tetes HCL pekat. Terbentuknya perubahan warna merah, kuning atau jingga menandakan adanya kandungan flavonoid

b) Identifikasi golongan saponin

Uji saponin, yaitu 0,5 gram ekstrak brokoli dari hasil ekstraksi ditambah dengan 0,5 ml air panas, dikocok kuat

selama 10 detik sampai menimbulkan busa, kemudian ditambahkan HCl 1% dan ditunggu selama 10 menit, apabila busa tidak hilang maka ekstrak positif mengandung saponin (Lutfiyati *et al*)

c) Identifikasi golongan tanin

Uji tanin, yaitu ekstrak brokoli dari hasil ekstraksi dididihkan dengan 20 ml air kemudian disaring ditambah beberapa tetes FeCl 1%. Larutan ekstrak diamati apabila menghasilkan warna coklat kehijauan atau biru kehitaman, maka ekstrak positif mengandung tannin (Lutfiyati *et al.*, n.d.).

b. Parameter non spesifik

1) Penetapan Kadar Air

Pengukuran kadar air di lakukan dengan cara destilasi. Tabung penerima dan pendingin di bersihkan dengan seksama, kemudian di bilas dengan air dan di keringkan. Sejumlah zat yang di timbang dan di perkirakan mengandung 2 ml sampai 4 ml air di masukan ke dalam labu kering. Jika ekstrak berupa pasta di timbang dalam sehelai lembaran logam dengan ukuran yang sesuai dengan leher labu. Lebih kurang 200 ml toluena dimasukan ke dalam labu, di hubungkan ke alat. Toluene dituangkan ke dalam tabung penerima (R) melalui alat pendingin. Labu dipanaskan dengan hati-hati selama 15 menit.

Setelah toluena mulai mendidih larutan disuling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian air tersuling, kemudian kecepatan penyulingan ditingkatkan hingga 4

tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluena, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan lebih di basahi dengan toluen. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima pendingin dibiarkan hingga mencapai suhu kamar. Jika ada tetes air yang melekat pada pendingin tabung penerima digosok dengan karet yang dikaitkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluene hingga tetes air turun. Setelah air dan toluene memisah sempurna, baca volume air. Kadar air di hitung dalam persen.

2) Penetapan Kadar Abu

Lebih kurang 2 g sampai 3 g ekstrak yang telah di gerus dan di timbang seksama, di masukkan ke dalam krus silikat yang telah di pijarkan dan di tara, ratakan. Pijarkan perlahan hingga arang habis, dinginkan, timbang. Jika cara ini arang tidak dapat di hilangkan, tambahkan air panas, saring melalui kertas abu. Pijarkan sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

Rumus :

$$\text{Kadar Abu} = \frac{W}{\text{Bobot Sampel}} \times 100\%$$

Keterangan :

W = bobot sampel sebelum diabukan (g)

W_1 = bobot sampel + cawan sesudah Diabukan (g)

W_2 = bobot cawan kosong (g)

6. Pengujian Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan larutan DPPH 40 ppm

DPPH ditimbang sebanyak 2 mg dan dilarutkan dengan etanol pa hingga 50 ml dalam labu ukur.

b. Skrining Panjang gelombang Maksimal

Larutan DPPH 40 ppm kemudian dibiarkan 30 menit, diukur pada spektrofometri uv-vis, sehingga diperoleh Panjang gelombang maksimal dan nilai absorbansinya (Iryani, 2017).

c. Penentuan Operating Time

Penentuan *operating time* dilakukan dengan larutan DPPH 40 ppm yang diukur pada panjang gelombang maksium yang diperoleh (Rastuti dan Purwati, 2012)

d. Penentuan Kurva Baku

Kemudian dibuat kurva kalibrasi antara nilai persen inhibisi dan konsentrasi sampel untuk mendapatkan persamaan garis linear yang nantinya dipakai dalam perhitungan nilai IC_{50} dari ekstrak bunga brokoli. Nilai IC_{50} didapat menggunakan persamaan regresi linear $y=a+bx$. Nilai IC_{50} diperoleh dari nilai x pada persamaan regresi linier dan y adalah 50.

e. Uji Aktivitas Antioksidan Secara Kuantitatif

Larutan kontrol positif : kuersetin ditimbang sebanyak 1 mg dimasukkan ke dalam labu 10ml didapatkan larutan induk uk 100 ppm dan diencerkan hingga diperoleh larutan seri 1, 2, 3, 4, 5 ppm.

Larutan sampel uji berupa ekstrak dibuat larutan induk 1000 ppm dengan cara melarutkan 25 mg ekstrak kedalam 25 ml labu ukur dan diencerkan hingga diperoleh larutan seri 80, 100, 120, 140, dan 160 ppm.

f. Pengukuran Absorbansi Sampel

Masing-masing larutan uji dipipet 2ml, ditambahkan 2ml DPPH 40 ppm diukur serapanya pada panjang gelombang optimumnya. Setiap konsentrasi dilakukan replikasi 3x (Iryani, 2017).

F. Analisis Data

1. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{Rendemen} = \dots \times 100\%$$

2. Antioksidan

Nilai absorbansi yang didapatkan digunakan untuk menghitung persen inhibisi (%I) menggunakan persamaan berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \dots \times 100\%$$

Ket :

A_k = Absorbansi kontrol (eetanol dan DPPH)

A_s = Absorbansi sampel (sampel dan DPPH)