

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk menentukan pengaruh variasi pelarut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) secara kuantitatif dengan parameter nilai % inhibisi dan IC_{50} .

B. Lokasi Penelitian

Proses pembuatan simplisia, ekstraksi, uji kandungan fitokimia, dan uji aktivitas antioksidan ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo Ungaran pada bulan Mei-Juli 2023. Determinasi penelitian dilakukan di Universitas Negeri Semarang.

C. Subyek Penelitian

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) yang diambil dari Desa Getasan Kabupaten Semarang.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) sebanyak 600 gram, dengan kriteria bagian ujung biji labu (*Cucurbita moschata* D.) berbentuk bulat dan bagian pangkalnya

meruncing. Kulit permukaan bijinya licin dan buram dengan warna putih hingga kecokelatan.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

a. Alat untuk proses ekstraksi

Pisau, baskom, blender, timbangan analitik (OHAUS), gelas ukur, bekker glass, cawan penguap, kain flannel, ayakan no. 80 mesh, penangas air (FAITHFUL), kertas saring, oven (MEMMERT), *rotary evaporator* (RE 2000E).

b. Alat untuk identifikasi

Tabung reaksi (PYREX), pipet tetes, pipet ukur (IWAKI), pipa kapiler, *chamber*.

c. Alat untuk uji aktivitas antioksidan

Gelas ukur (IWAKI), bekker glass, Timbangan analitik, labu takar (IWAKI), kuvet, tabung reaksi (PYREX), pipet tetes, pipet ukur (IWAKI), mikro pipet, spektrofotometer UV-Vis (SHIMADZU).

2. Bahan

a. Bahan untuk proses ekstraksi

Serbuk biji labu kuning, aquades, etanol teknis 96%, etil asetat, n-heksan.

b. Bahan untuk identifikasi

Etanol p.a, Aquades, serbuk Mg, HCl pekat, H₂SO₄ pekat, FeCl₃ 10%, FeCl₃ 5%, serbuk AlCl₃, AlCl₃ 10%, silika gel GF254.

c. Bahan untuk pengujian aktivitas antioksidan

Etanol p.a, Pereaksi DPPH (*Tokyo Chemical Industri*), etanol 96% (teknis), etil asetat (teknis), n-heksan (teknis), ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.), Kuersetin (Merck)

E. Definisi Operasional

1. Aktivitas antioksidan adalah penentuan aktivitas antioksidan ekstrak biji labu kuning berbagai variasi pelarut menggunakan metode peredaman DPPH
2. Nilai IC_{50} pada pengujian efek antioksidan adalah angka yang mencerminkan konsentrasi ekstrak etil asetat, etanol 96%, dan N-heksan dari biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) ($\mu\text{g/mL}$) yang memiliki kemampuan untuk menghambat oksidasi sebesar 50% memiliki potensi antioksidan yang sangat tinggi jika nilai IC_{50} yang dihasilkan kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$, namun menunjukkan efek yang kurang signifikan jika nilai IC_{50} yang dihasilkan lebih dari 150 $\mu\text{g/mL}$.
3. Ekstraksi biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) adalah proses ekstraksi biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan variasi pelarut N-heksan, etanol 96%, etil asetat.

F. Variabel Penelitian

1. Variable bebas

Ekstrak etanol 96%, N-heksan, Etil asetat biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.)

2. Variable tergantung

Aktivitas antioksidan ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.)

3. Variable terkontrol

Cahaya, suhu, waktu, Panjang gelombang absorbansi

G. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan simplisia

Biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) yang didapat dari petani labu kuning di Desa Getasan Kabupaten Semarang sebanyak 1000 g, dipilah, dicuci, dipotong kecil, dan dikeringkan dengan cara dioven dengan suhu 50°C lalu dijemur di bawah sinar matahari sampai kering. Setelah itu, biji tersebut dihaluskan menggunakan blender.

2. Pembuatan ekstrak etanol biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.)

Metode ekstraksi biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) dilakukan dengan teknik maserasi dengan variasi pelarut n-heksan, etanol 96%, etil asetat. Serbuk biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) yang telah diayak ditimbang sebanyak 200 g direndam dalam pelarut n-heksan, etanol 96%, etil asetat 1,5 L

(hingga serbuk terendam sepenuhnya) selama 48 jam. Kemudian dilakukan remaserasi dengan menggunakan 0,5 L pelarut hingga filtrat yang dihasilkan berwarna bening. Selama proses tersebut berlangsung dilakukan pengadukan berkala. Ekstrak pelarut n-heksan, etanol 96%, etil asetat biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan dilanjutkan dengan penangas air pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental (Setiawan, 2018).

3. Uji senyawa metabolit

a. Uji senyawa metabolit secara kualitatif

1) Flavonoid

Sejumlah 40 mg ekstrak dicampur dengan 100 ml air mendidih, lalu direbus selama 5 menit, dan kemudian disaring. Larutan yang terfilter diukur sebanyak 5 mL, lalu diberi tambahan 0,05 mg bubuk Mg dan 1 mL HCl pekat, setelah itu dikocok. Hasil yang positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan menjadi merah, kuning, atau jingga (Wijaya *et al*, 2014).

2) Saponin

Sebanyak 40 mg ekstrak dicampurkan dengan 10 ml air panas, kemudian diaduk selama 1 menit, dan ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Apabila busa yang terbentuk tetap stabil selama kurang lebih 10 menit, maka ekstrak menunjukkan hasil yang positif mengandung saponin (Wijaya *et al*, 2014).

3) Terpenoid

Sejumlah 100 mg ekstrak diukur kemudian dilarutkan menggunakan 10 mL air. Setelah itu, larutan ekstrak sebanyak 2 mL diambil dan dicampurkan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat. Keberhasilan reaksi ditandai dengan munculnya warna merah atau ungu. (Cahyaningsih *et al*, 2019)

4) Tanin

Sejumlah 40 mg ekstrak dilarutkan dalam 4 mL air, setelah itu ekstrak yang telah larut diambil sebanyak 2 mL, dan kemudian dicampur dengan 1 mL FeCl₃ 10%. Tanda reaksi positif terlihat dari terbentuknya warna biru gelap atau hijau kehitaman (Cahyaningsih *et al*, 2019)

b. Uji senyawa metabolit dengan KLT

Pengujian kandungan senyawa *metabolit* pada ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.) menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada identifikasi kandungan flavonoid dengan metode KLT digunakan fase gerak butanol : asam asetat : air (4:1:5) dan fase diam silica gel GF 254. Fase diam sebelum digunakan diaktivasi terlebih dahulu pada suhu 105°C selama 30 menit. Penotolan sampel dilakukan dengan melarutkan ekstrak kental dengan etanol 96% agar konsistensi ekstrak menjadi lebih cair, setelah itu ditotolkan pada fase diam

plat silica gel. Penotolan dilakukan menggunakan pipa kapiler. Fase diam selanjutnya dimasukkan ke dalam chamber yang berisi campuran fase gerak yang sudah dijenuhkan. Fase diam selanjutnya dielusi, kemudian dikeringkan dan diamati bercaknya. Bercak dihasilkan dilakukan pengamatan menggunakan lampu UV 366 nm. Penampak bercak yang digunakan pada pengujian ini yaitu AlCl_3 10%. Bercak dihitung nilai R_f (faktor retensi), untuk mengetahui adanya kandungan flavonoid pada sampel ekstrak labu kuning. Nilai R_f dapat dihitung menggunakan rumus sebagai

$$\text{berikut: } R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solute (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen (cm)}}$$

(Nurani dan Pujiastuti, 2023)

4. Pembuatan larutan pembanding kuersetin

Sebanyak 25 mg kuersetin di larutkan dalam 25 mL labu ukur lalu dicukupkan dengan etanol p.a untuk mencapai konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Pembuatan larutan stok dengan pengenceran, menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 5 ppm, dan 6 ppm. Setiap larutan stok ini dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan etanol p.a hingga mencapai tanda batas.

5. Penentuan *operating time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara sebanyak 4 mL larutan DPPH 40 ppm dicampur dengan 1 mL larutan uji. Absorbansi campuran ini diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan, dengan

interval waktu 5 menit. Pengukuran dilakukan berulang hingga absorbansi stabil dan tidak ada penurunan yang terlihat (Rastuti dan Purwati, 2012).

6. Pembuatan seri konsentrasi kuersetin

Pembuatan deret baku kuersetin dilakukan dengan cara 4 mL larutan DPPH 40 ppm dicampur dengan masing-masing 1 mL larutan uji konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 5 ppm, dan 6 ppm. Campuran ini dibiarkan selama *operating time* yang telah ditentukan sebelum kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (Rustina, 2012).

7. Pembuatan stok DPPH (1000 ppm)

Sebanyak 10 mg serbuk DPPH ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm (Rustina, 2012).

8. Pembuatan larutan DPPH 40 ppm

Sebanyak 2 mL larutan stok DPPH 1000 ppm dipipet kedalam labu ukur 50 mL, kemudian dicukupkan dengan etanol p.a hingga tanda batas. Perhitungan larutan DPPH 40 ppm sebagai berikut :

$$V1.C1 = V2.C2$$

$$V1.1000 = 50.40$$

$$V1 = 2000/1000$$

$$V1 = 2 \text{ ml (dalam labu ukur 50 mL)}$$

9. Pembuatan larutan induk sampel

Sebanyak 25 mg ekstrak etanol 96%, n-heksan, etil asetat biji (*Cucurbita moschata* D.) ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Sampel kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda sehingga didapatkan konsentrasi 1 mg/mL (Rastuti and Purwati, 2012).

10. Pembuatan Seri Konsentrasi

Seri konsentrasi ekstrak etanol 96%, n-heksan, etil asetat biji (*Cucurbita moschata* D.) dibuat dalam konsentrasi (100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL) dibuat dengan sistem pengenceran yaitu dari larutan induk konsentrasi 1 mg/mL. (Rastuti and Purwati, 2012)

11. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko yang digunakan adalah 4 mL larutan DPPH 40 ppm yang ditambahkan dengan 1 mL etanol p.a.

12. Pengujian DPPH

a. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Sebanyak 4 mL larutan DPPH 40 ppm dan ditambahkan dengan 1 mL etanol. Setelah dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap, serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-600 nm (Rastuti and Purwati, 2012).

b. Penentuan *operating time* DPPH

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara 4 mL larutan DPPH 40 ppm ditambah dengan 1 mL larutan uji 100 ppm (larutan uji ekstrak etanol 96%, n-heksan, etil asetat). Larutan tersebut diukur absorbansinya pada

panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 5 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil dan tidak terlihat adanya penurunan absorbansi (Rastuti and Purwati, 2012).

- c. Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96%, N-heksan, dan etil asetat biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.)

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara 4 mL larutan DPPH 40 ppm ditambah dengan masing-masing 1 mL larutan uji ekstrak etanol 96%, n-heksan, dan etil asetat konsentrasi (100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL). Campuran didiamkan selama waktu *operating time* yang telah diperoleh. Larutan ini kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum, sebagai pembanding digunakan kuersetin dengan konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 5 ppm dan 6 ppm dengan perlakuan sama dengan larutan uji. Perhitungan potensi antioksidan dengan metode DPPH dilakukan dengan menghitung IC_{50} untuk masing-masing sampel dengan menggunakan rumus persamaan garis regresi linier yang diperoleh dari grafik hubungan antara konsentrasi dengan % peredaman DPPH ekstrak etanol, n-heksan, dan etil asetat (Rastuti and Purwati, 2012).

Harga (IC_{50}) dapat dikategorikan sebagai berikut :

- a. <50 ppm : antioksidan sangat kuat
- b. 50-100 ppm : antioksidan kuat
- c. 101-150 ppm : antioksidan sedang

d. >150 ppm : antioksidan lemah

H. Analisis data

Aktivitas antioksidan dapat diukur menggunakan parameter *inhibisi concentration 50% (IC₅₀)*, yang mengacu pada konsentrasi sampel yang mampu menetralkan sebanyak 50% radikal DPPH. Data yang diambil termasuk nilai absorbansi ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan dari biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.), serta nilai absorbansi pembanding kuersetin. Selanjutnya, persentase aktivitas antioksidan dihitung dengan membandingkan nilai absorbansi sampel dengan nilai absorbansi kontrol, dan kemudian hasilnya dibagi dengan nilai absorbansi kontrol dan dikalikan dengan 100%.

Rumus menghitung % aktivitas antioksidan:

$$\% \text{perendaman DPPH} = \frac{\text{absorban kontrol} - \text{absorban sampel}}{\text{absorban kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan :

Absorbansi kontrol : Absorbansi DPPH

Absorbansi sampel : Absorbansi ekstrak etanol, etil asetat, n-heksan biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.)

Setelah diperoleh persentase penghambatan dari tiap konsentrasi, langkah selanjutnya adalah melakukan perhitungan secara regresi linier (x, y) untuk mendapatkan nilai konsentrasi inhibisi 50% (*IC₅₀*), di mana x merepresentasikan konsentrasi (µg/mL) dan y merepresentasikan persentase aktivitas (%). Nilai *IC₅₀* untuk sampel dan pembanding dihitung menggunakan rumus berikut:

$Y = Bx + A$ (IC_{50} diperoleh dari x setelah menggantikan y dengan 50) (Rastuti dan Purwati, 2012).