

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental dengan melakukan pengujian perbandingan aktivitas antioksidan ekstrak etanol terpurifikasi ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dengan vitamin E.

#### **B. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian**

1. Penelitian di lakukan di Laboratorium Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
2. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biofarmasetika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

#### **C. Variabel Penelitian**

Variabel penelitian di klasifikasikan menjadi tiga, yaitu:

##### **1. Variabel bebas**

Variabel bebas adalah variabel yang variasinya berpengaruh terhadap variabel lain. Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol terpurifikasi ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) 20, 100, 200, 300, dan 500 ppm dan konsentrasi vitamin E 2,5; 5; 7,5; 10 dan 20 ppm.

##### **2. Variabel terikat**

Variabel terikat dalah variabel penelitian yang diukur untuk mengetahui besarnya efek atau pengaruh dari variabel lain. Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan ekstrak etanol terpurifikasi ubi

jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dan vitamin E yang di ukur dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dengan hasil ukur berupapenurunan kadar DPPH dengan menghitung % inhibisi dan nilai aktifitas IC<sub>50</sub>.

### 3. Variabel terkendali

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat, sehingga perlu diterapkan kualifikasinya agar hasil yang ditetapkan tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah metode ekstraksi, konsentrasi dan penyimpanan DPPH.

## **D. Prosedur Penelitian**

### 1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan dengan tujuan untuk menghindari kesalahan pengambilan sampel untuk bahan penelitian dan untuk memastikan bahwa sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah benar umbi jalar ungu. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biofarmasetika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

### 2. Pembuatan simplisia

Ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) yang telah di dapatkan kemudian dipilih bahan baku yang dalam keadaan baik. Kemudian dilakukan pembersihan kotoran yang masih menempel pada umbi jalar ungu yang selanjutnya di cuci hingga bersih. Setelah pencucian umbi jalar

ungu dikupas dan di ambil dagingnya kemudian di potong setebal 0.5 cm. Pengubahan bentuk menjadi lebih kecil dilakukan untuk mempercepat proses pengeringan. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air, mempertahankan daya fisiologis bahan, mengawetkan produk dan mempertahankan kualitas produk. Metode pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang. Setelah simplisia kering dipilih simplisia yang dalam keadaan baik dan dihaluskan dengan cara di blender menjadi serbuk, kemudian diayak dengan menggunakan ayakan nomor 60.

### 3. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak ubi jalar ungu megunakan metode maserasi. Pembuatan ekstrak dengan metode maserasi menggunakan perbandingan 1:10, yaitu dengan 100 gram serbuk simplisia banding 1 liter etanol 96%. Proses ekstraksi dilakukan selama 7 hari yaitu dengan 5 hari proses maserasi dan 2 hari proses remaserasi. Proses maserasi dilakukan perendaman 100 gram simplisia pada camber kaca tertutup rapat dengan volume pelarut etanol 96% sebanyak 750ml dan aduk 1 kali sehari selama 5 menit. Kemudian selanjutnya dilakukan proses remaserasi yaitu ampas proses maserasi direndam kembalipada camber kaca terturup rapat dengan pelarut etanol 96% sebanyak 250 ml dan aduk sekali sehari selama 5 menit. Hasil maserat dan remaserat kemudian dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu kurang lebih 50°C. Tujuan penggunaan *vacuum rotary evaporator* adalah untuk memekatkan ekstrak dan menguapkan pelarut yang masih ada pada ekstrak.

#### 4. Pemurnian ekstrak (purifikasi)

Ekstrak kasar yang didapatkan kemudian dilakukan pemurnian dengan menggunakan n-heksan dengan perbandingan 1:10. Sebanyak 10 g ekstrak kental di larutkan dalam 50 ml etanol dimasukkan ke dalam corong pisah. Kemudian ditambahkan dengan 100 ml n-heksan ke dalam corong pisah kemudian digojok dan dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan. Ambil lapisan etanol dan dipadatkan dengan *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut yang masih ada pada ekstrak.

#### 5. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara memasukkan ekstrak ke dalam tabung reaksi, kemudian menambahkan 2 tetes asam asetat dan 2 tetes asam sulfat pekat. Selanjutnya dilakukan pemanasan sampai ekstrak tidak berbau ester.

#### 6. Uji fitokimia antosianin

Uji dilakukan dengan menimbang 0,5 g ekstrak ditambahkan dengan asam sulfat 2M kemudian dipanaskan selama 5 menit. Hasil positif jika timbul warna merah.

#### 7. Uji aktivitas antioksidan

##### a. Pembuatan larutan DPPH 0,004 %

Menimbang serbuk DPPH sebanyak 50 mg, masukkan dalam labu ukur 100 ml dan tambahkan etanol p.a sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 0,05%. Dari konsentrasi tersebut kemudian encerkan kembali menjadi konsentrasi 0,004%. Untuk

mendapatkan larutan 0,004% di tambahkan 8 ml etanol p.a pada larutan DPPH 0,05% (Molyneux, 2004).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Larutan DPPH 0,004% sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung raksi lalu ditambahkan etanol p.a sebanyak 2 ml, dikocok hingga homogen lalu dituang ke dalam kuvet dan diukur pada panjang gelombang 450-600 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

c. Pembuatan larutan kontrol

Larutan DPPH 0,004% sebanyak 2 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan etanol p.a sebanyak 2 ml kocok hingga homogen, di diamkan dalam ruangan gelap selama 30 menit (Molyneux, 2004). Selanjutnya serapan diukur pada panjang gelombang maksimum yang di dapatkan.

d. Pembuatan larutan induk umbi jalar ungu konsentrasi 1000 ppm

Ekstrak umbi jalar ungu ditimbang 0,05 g, dilarutkan dengan etanol p.a, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml. Volume dicukupkan dengan etanol sampai tanda batas.

e. Pembuatan larutan induk vitamin E konsentrasi 1000 ppm

Vitamin E serbuk ditimbang 0,05 g, dilarutkan dengan etanol p.a, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml. Volume dicukupkan dengan etanol p.a sampai tanda batas.

f. Operating time

- 1) Larutan DPPH 0,004% sebanyak 2 ml di masukan ke dalam tabung reaksi kemudian di tambahkan dengan etanol sebanyak 2 ml, selanjutnya di homogenkan dengan cara di vortex selama 30 detik dan di ukur panjang gelombangnya pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60.
- 2) Larutan vitamin E 2,5 ppm di ambil sebanyak 3 ml di tambah 3 ml DPPH 0,004%, selanjutnya di homogenkan dengan cara di vortex selama 30 detik dan di ukur panjang gelombangnya pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60.

g. Pembuatan larutan seri umbi jalar ungu 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm

Larutan induk masing-masing di pipet 0,5; 1; 1,5; 2 dan 2,5 ml dimasukan kedalam labu ukur 10 ml dan cukupkan volume sampai tanda batas.

h. Pembuatan larutan seri vitamin E 2,5; 5; 7,5; 10 dan 20 ppm

Larutan induk masing-masing di pipet 25, 50, 75, 100 dan 125  $\mu$ l dimasukan kedalam labu ukur 10 ml dan cukupkan volume sampai tanda batas.

i. Pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis

Larutan uji ekstrak sebanyak 2 ml dimasukan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan larutan DPPH 0,004% sebanyak 2 ml, kemudian di kocok homogen dan di diamkan dalam ruangan gelap sesuai dengan

hasil OT. Selanjtnya mencatat absorbansi yang terdapat pada panjang gelombang maksimum. Lakukan langkah yang sama pada sampel vitamin E.

j. Penentuan nilai IC<sub>50</sub>

Penentuan aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *inhibisi concentration* 50% atau IC<sub>50</sub> yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Untuk mendapatkan nilai aktivitas antioksidan yang pertama adalah dengan menghitung nilai % inhibisi. Aktivitas penangkal radikal bebas di ekspresikan sebagai persen inhibisi yang dapat di hitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \left( \frac{\text{Absorban kontrol} - \text{Absorban bahan uji}}{\text{Absorban kontrol}} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

Absorban kontrol : absorbansi DPPH

Absorban bahan uji : absorbansi ekstrak umbi jalar ungu terpurifikasi dan vitamin E

(Ghosal& Mandal, 2012)

Setelah didapatkan nilai inhibisi maka selanjutnya nilai persentase inhibisi diplot dibuat regresi linier untuk di dapatkan nilai sumbu x dan sumbu y. Persamaan yang didapatkan kemudian di masukan kedalam rumus untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub>. Persamaan tersebut dapat di hitung dengan rumus berikut:

$$y = bx + a$$

Dimana nilai  $y$  adalah penghambatan 50%, maka nilai  $y$  di masukan angka 50.

#### **E. Analisis Data**

Analisis data pada penelitian ini adalah untuk menentukan perbandingan nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol terpurifikasi ubi jalar ungu dengan nilai  $IC_{50}$  vitamin E. Hasil dari penelitian kemudian dianalisis menggunakan T-test atau Uji T. Dalam penelitian akan didapat rata-rata nilai  $IC_{50}$  yang selanjutnya dibuat grafik dan tabel untuk menentukan nilai perbandingan dari nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol umbi jalar ungu terpurifikasi dengan nilai  $IC_{50}$  vitamin E.