

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan penelitian

Jenis penelitian ini secara kuantitatif yang menggunakan metode penelitian secara eksperimental laboratorium yang bertujuan menguji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH sebagai kapasitas antioksidan ekstrak buah apel anna.

3.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dilaboratorium kimia dan dilaboratorium farmasetika jurusan Farmasi Stikes Panti Waluya Malang.

3.2.1 Populasi

Pada penelitian ini digunakan populasi dari apel anna (*Malus sylvestris*) yang berasal dari Kota Batu.

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel yang digunakan adalah ekstrak daging buah apel anna (*Malus sylvestris*).

3.2.3 Kriteria inklusi

Kriteria inklusi sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah apel anna, yang berwarna kuning kemerahan, tidak busuk, tidak layu, kulit tidak keriput.

3.2.4 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah apel anna, bentuk tidak sempurna, buah cacat, busuk, buah kecil, luka gigitan hewan.

3.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas (*Independent*) dalam penelitian ini adalah ekstrak daging buah apel anna (*Malus sylvestris*)

3.3.2 Variabel terikat

Variabel terikat (*Dependent*) pada penelitian ini adalah nilai IC₅₀ dalam ekstrak buah apel anna (*Malus sylvestris*).

3.4 Definisi Operasional

1. Apel anna (*Malus sylvestris*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah apel segar yang belum mengalami proses tambahan seperti pemanasan dan pengeringan, yang memiliki kulit tipis dengan warna kuning agak kemerahan yang didapat dipasar buah Kota Batu.
2. Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghambat dan mencegah proses oksidasi. Mekanisme kerjanya melibatkan penghentian reaksi radikal bebas yang terbentuk dari metabolisme tubuh atau dari sumber eksternal yang menghasilkan radikal bebas. Flavonoid dan polifenol adalah contoh senyawa kimia yang berperan aktif sebagai antioksidan.
3. Maserasi dengan cara merendam bahan dengan pelarut lainnya yang sesuai dengan senyawa aktif dari bahan tersebut. Metode ini dapat dilakukan dengan tanpa proses pemanasan.
4. Uji DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang sangat stabil sehingga dapat digunakan sebagai pereaksi dalam uji.
5. Spektrofotometer UV-Vis merupakan instrumen penting dalam analisis kimia. Instrumen ini digunakan untuk menguji sampel dengan panjang tertentu dengan panjang maksimum 517nm yang berorientasi pada pengukuran kualitatif dan kuantitatif.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Rotary Evaporator, Spektrofotometri UV-Vis, Vial, Timbangan analitik, Corong, Oven, Gelas ukur, Cawan porselin, Saringan, Batang pengaduk, Pipet tetes, Waterbath, *Push ball*, Gelas breaker, Labu ukur, Mikropipet, Blender serbuk, Alumunium foil, Botol kaca gelap.

3.5.2 Bahan

Sampel Daging Buah Apel Anna (*Malus sylvestris*), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhrazy), Etanol 70%, Vitamin C, Aquadest, Metanol

3.6 Tempat dan Waktu Penelitian

3.6.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dilaboratorium Kimia Terpadu dan laboratorium Farmasetika Stikes Panti Waluya Malang

3.6.2 Waktu Penelitian

Rencana Kegiatan	Bulan						
	Januari	Febuari	Maret	April	Mei	Juni	Juli
Seminar proposal							
Penelitian							
Pengumpulan data							
Analisis data							
Penyusunan laporan							
Seminar hasil							

3.7 Prosedur Kerja

3.7.1 Pengolahan Sampel

1. Preparasi sampel

- A. Buah apel disortasi dengan cara dicuci bersih dibawah air mengalir.
- B. Kemudian dikupas kulit apel, diiris tipis tipis tanpa terkena sinar matahari langsung
- C. Kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C selama 2x24 jam.
- D. Simplisia yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender menjadi serbuk simplisia
- E. Simplisia siap digunakan untuk uji selanjutnya

2. Pembuatan ekstrak apel anna

- A. Timbang simplisia buah apel yang dikeringkan menggunakan oven sebanyak 100 gram masukkan ke dalam wadah maserasi.
- B. Tambahkan 800 ml pelarut etanol 70% (1:8) ke dalamnya wadah toples kaca, aduk campuran dengan batang pengaduk hingga homogen.
- C. kemudian tutup toples kaca rapat, dengan aluminium foil dan biarkan selama 4 hari. Sesekali dilakukan pengadukan.
- D. Saring dengan saringan kain kemudian hasil maserat kedalam wadah sampai di dapat maserat 1
- E. Remasi kembali kedalam wadah toples proses ekstraksi dan tambahkan etanol 70% sampai semua simplisia terendam, kemudian tutup dengan aluminium foil dan biarkan selama 3 hari.
- F. Kemudian saring kembali hasil sampai didapat maserat 2.
- G. Kumpulkan maserat 1 dan 2 dan uapkan maserat tersebut dengan alat rotary evaporator dengan rpm 75 rpm dengan suhu 50 °C
- H. Kemudian dipanaskan dengan water bath suhu 50 °C sehingga di peroleh hasil ekstrak kental daging apel anna (Pertiwi *et al.*, 2016).

3.7.2 Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil)

1. Pembuatan Larutan Induk DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil)

- A. Menimbang dengan teliti sekitar 25 mg DPPH dan larutkan dalam metanol di dalam labu ukur 25 ml, sehingga dihasilkan larutan dengan konsentrasi 1000 µg/ml.
- B. Pipet 2 ml dilarutkan dengan metanol hingga 50,0 ml sehingga diperoleh konsentrasi 0,004% atau 40 µg/ml. Larutan disimpan pada suhu rendah, terlindung dari cahaya
- C. Menentukan panjang gelombang maksimum DPPH
- D. Larutan DPPH 0,004% (40 µg/ml) diukur menggunakan spektrofotometer UV pada rentang panjang gelombang 400 nm hingga 600 nm kemudian ditentukan panjang gelombang maksimumnya.
- E. Pembuatan larutan kontrol
- F. Membuat larutan kontrol pipet sebanyak 200 µL metanol kemudian dimasukkan ke dalam vial dan ditambahkan 800 µL larutan DPPH kocok hingga homogen dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.

2. Pembuatan Larutan Sampel (Ekstrak Daging Buah Apel Anna)

- A. Menimbang ekstrak kental daging buah apel sebanyak 500 mg dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL, tambahkan etanol 70 % hingga tanda batas 50 mL diperoleh konsentrasi 1000 ppm.
- B. Siapkan labu ukur 50 mL sebanyak 5 untuk pembuatan pengenceran bertingkat 500,400,300,200,100 ppm
- C. Masing masing sampel ditambahkan etanol 70% sampai tanda batas sehingga dihasilkan larutan sampel dengan berbagai konsentrasi yaitu 500,400,300,200,100 ppm (Pertiwi *et al.*, 2016)

3. Pembuatan pembanding Vitamin C

- A. Vitamin C ditimbang 0,5 mg ditambahkan air sampai 50,0 ml sehingga diperoleh kadar 1%
- B. Dibuat seri konsentrasi sebesar 500, 400, 300, 200, 100 ppm (Widyowati *et al.*, 2014)
- C. Pembanding yang digunakan Vitamin C konsentrasi 500, 400, 300, 200, 100 ppm dengan perlakuan yang sama dengan larutan uji.

4. Pembuatan blanko DPPH 0,1 mM

- A. Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 3,9 mg dan dilarutkan dalam metanol sampai tepat 100,0 mL (0,1mM) (Widyowati *et al.*, 2014)

5. penentuan aktivitas antioksidan

- A. Pipet 800 μ L larutan DPPH 0,004%, dipipet 200 μ L dari setiap larutan uji ekstrak konsentrasi 500,400,300,200,100 ppm
- B. Didiamkan selama 30 menit untuk operating time yang telah diperoleh.
- C. Larutan ini kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH. Larutan metanol 1000 μ L digunakan sebagai blanko, sedangkan sebagai kontrol digunakan larutan DPPH yang dicampur dengan metanol dalam rasio 4:1 (800 μ L DPPH : 200 μ L metanol).

3.8 Analisis Data

Perhitungan presentase antioksidan dapat menggunakan rumus:

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \frac{\text{absorbansi DPPH kontrol} - \text{absorbansi DPPH sisa}}{\text{absorbansi DPPH kontrol}} \times 100\%$$

Data yang diperoleh pada penelitian ini dianalisa menggunakan aplikasi software Excel 2007 dengan konsentrasi rata rata % aktivitas antioksidan sehingga mendapatkan regresi nilai $y=bx+a$ kemudian dihitung nilai $IC_{50}(x)$ dengan rumus berikut : $\frac{50-a}{b}$

3.9 Kerangka kerja

