

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian uji aktivitas antioksidan jantung pisang ambon (*M. paradisiaca* var *sapientum* L). Rancangan penelitian ini menggunakan Praeksperimental dengan rancangan *one shot case study*. Penelitian ini menerapkan rancangan dasar berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan tiga sampel ekstrak yaitu ekstrak kental n-heksana, etil asetat dan etanol dengan menggunakan Metode DPPH yang dimana setiap pengujiannya dilakukan secara triplo. Pada setiap sampel dilakukan pengujian Skrining Fitokimia, Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan pengujian aktivitas antioksidan dengan mengukur IC₅₀.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu simplisia jantung pisang ambon yang diperoleh dan di ekstraksi di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO).

3.3 Bahan dan Alat

3.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Cawan, *beaker glass* (Pyrex), labu ukur, tabung reaksi (Pyrex), rak tabung reaksi, batang pengaduk, vial, neraca analitik, satu set alat maserator, spatel logam, pipet tetes, mikropipet (Eppendorf), kaca arloji, satu set alat spektrofotometer *UV-Visible* (Shimadzu), *Rotary evaporator*

(Buchi), oven (Mommert), chamber, pipa kapier, plat KLT, lampu UV sebagai penampak noda, mortir dan stamper, kuvet.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu simplisia Jantung pisang ambon (1kg), etanol 96%, etil asetat, N-heksana, DPPH, methanol pa, asam askorbat, ammonia (NH_4OH), kloroform (CHCl_3), HCl, pereaksi mayer, pereaksi dragendrof, Mg, natrium asetat (CH_3COONa), FeCl_3 , gelatin, KOH, Liberman Buchard, aluminium foil, kertas saring, DPPH 0,2% (Sebagai reagen penampak bercak)

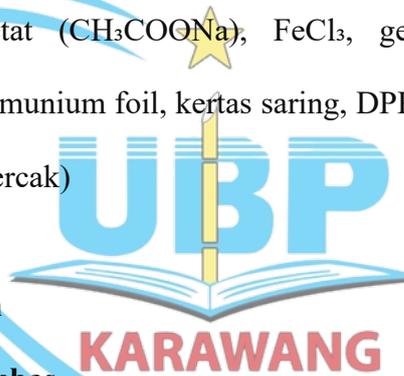
3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu variasi konsentrasi ekstrak kental n-heksana, ekstrak kental etil asetat dan ekstrak kental etanol jantung pisang ambon.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pengujian bobot jenis, kadar air, kadar sari larut air dan larut etanol, skrining fitokimia, kromatografi lapis tipis (KLT), pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dengan mengukur IC_{50} .



3.4.3 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variable Bebas					
1	Konsentrasi ekstrak kental n-heksana, ekstrak kental etil asetat dan ekstrak kental etanol jantung pisang ambon	Konsentrasi yang diperoleh diambil dari sampel yang dibuat dengan variasi konsentrasi	Pengujian meliputi aktivitas antioksidasi menggunakan Metode DPPH	Nominal	1. Ekstrak kental n-heksana 2. ekstrak kental etil asetat 3. ekstrak kental etanol
Variabel Terikat					
1	Uji DPPH	Uji DPPH dilakukan dengan alat Spektrofotometer <i>UV-Visible</i> untuk meredam radikal bebas DPPH	Spektrofotometer <i>UV-Visible</i>	Rasio	% (Persen)

3.5 Prosedur Penelitian

Berikut ini merupakan prosedur kerja dari penelitian kali ini, diantaranya :

3.5.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman jantung pisang ambon utuh dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Malang, Jawa timur. Determinasi ini dilakukan untuk diidentifikasi kebenaran identitas tanaman jantung pisang ambon yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologis yang terdapat pada tanaman jantung pisang ambon.

3.5.2 Penyiapan Simplisia

Jantung pisang ambon yang didapatkan dari BALITRO disortasi basah atau dipisahkan dari benda asing yang tidak terpakai, kemudian dicuci hingga bersih pada air mengalir, jantung pisang ambon dirajang kecil-kecil untuk memudahkan dalam proses pengerigan, selanjutnya pengeringan dengan oven pada suhu 45°C. Simplisia jantung pisang ambon yang sudah kering kemudian digiling hingga membentuk serbuk simplisia, kemudian disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat.

3.5.3 Parameter Mutu Simplisia

1. Bobot Jenis

Penetapan bobot jenis dilakukan dengan cara menimbang piknometer kosong dalam volume tertentu. Kerapatan air dapat dicari dengan mengisi piknometer dengan air dan ditimbang, kemudian air yang ada dalam piknometer dikeluarkan dan kemudian keringkan. Selanjutnya mencari kerapatan dengan memasukan simplisia kedalam piknometer dan ditimbang (Marpaung dan Anggun, 2020; Fikayuniar, 2020).

Bobot jenis dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Bobot Jenis} = \frac{w_2 - w_0}{w_1 - w_0}$$

Keterangan :

- w₀ : Piknometer kosong (g)
- w₁ : Piknometer + air (g)
- w₂ : Piknometer + ekstrak (g)

2. Kadar Air

Penetapan kadar air dengan metode gravimetric dilakukan dengan cara menimbang simplisia 5 g dalam cawan yang sebelumnya telah dipanaskan pada oven 100-105°C (30 menit). Ratakan simplisia dalam cawan. Masukkan kedalam oven dengan suhu 105°C selama 3jam hingga bobot tetap. Masukkan cawan pada desikator selama 15 menit. Kemudian timbang. Masukkan kembali kedalam oven selama 1jam dengan suhu 105°C hingga bobot tetap. Bila perbedaan hasil penimbangan tidak lebih dari 0,5 mg/g sampe maka dianggap bobot tetap (Asmariansi, 2019).

Dihitung menggunakan rumus :

$$SP = \frac{b. awal - b. akhir}{b. awal} \times 100\%$$

3. Kadar Sari

Penetapan kadar sari terdiri dari penetapan kadar sari larut dalam air dan penetapan kadar sari larut dalam etanol, yaitu :

1. Kadar sari yang larut dalam air

Masukan 2 gram simplisia kedalam labu ukur 100 mL dan tambahkan air 90 mL dan kloroform 10 mL. Campuran sesekali dikocok secara berulang selama 6 jam dan didiamkan \pm 18 jam. Kemudian disaring dan diambil 20 mL filtrat lalu uapkan menggunakan cawan (Febrianti, 2019). Kemudian residu dipanaskan menggunakan oven dengan suhu 105°C hingga diperoleh bobot tetap (Marpaung dan Anggun, 2020).

Rumus :

$$KSLA = \frac{\text{Berat sari}}{\text{Berat simplisia}} = \frac{V \text{ pelarut}}{V \text{ filtrat}} \times 100\%$$

2. Kadar sari yang larut dalam etanol

Masukan 2 gram ekstrak kedalam labu ukur 100 mL dan tambahkan etanol 96%. Campuran sesekali dikocok secara berulang selama 6 jam dan didiamkan \pm 18 jam. Kemudian disaring dan diambil 20 mL filtrat lalu uapkan menggunakan cawan (Febrianti, 2019). Kemudian residu dipanaskan menggunakan oven dengan suhu 105°C hingga diperoleh bobot tetap (Marpaung dan Anggun, 2020).

Rumus:

$$KSLE = \frac{\text{Berat sari}}{\text{Berat simplisia}} = \frac{V \text{ pelarut}}{V \text{ filtrat}} \times 100\%$$

3.5.5 Ekstraksi

Pembuatan ekstrak dari jantung pisang ambon (*Musa paradisiaca* var *sapientum* L) dilakukan dengan metode maserasi dan menggunakan tiga pelarut yaitu pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol. Metode maserasi ini merupakan metode dengan menggunakan cara dingin. Proses metode maserasi yaitu dengan menuangkan Pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol dengan bergantian secara perlahan kedalam maserator dengan urutan maserasi bertingkat dimulai di maserari dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan terakhir oleh etanol dan dibiarkan selama 10 menit

agar terjadi proses pembasahan kemudian tambahkan kembali pelarut sampai simplisia terendam. Biarkan selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Setelah dibiarkan selama 24 jam kemudian ekstrak cair di tampung pada penampung dan ulangi ekstraksi hingga diperoleh ekstrak cair yang tidak berwarna. Setelah proses maserasi selesai dan telah didapatkan ekstrak cair dari ketiga pelarut tersebut, kemudian ekstrak cair tersebut diuapkan menggunakan *Rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

3.5.6 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia mengacu kepada Fikayuniar (2021) yang dimodifikasi. Tahapan skrining fitokimia simplisia jantung pisang ambon sebagai berikut :

1. Alkaloid

Masukan sampel kemudian basahi dengan ammonia encer, gerus menggunakan mortir, kemudian tambahkan beberapa mL kloroform sambil digerus, kemudian disaring. Setelah disaring filtrat ditambahkan dengan asam klorida 2 N, kemudian kocok. Selanjutnya lapisan asam dipisahkan dan dibagi menjadi tiga bagian dalam tabung reaksi. Tabung reaksi I sebagai blanko. Tabung reaksi II ditetesi dengan pereaksi Mayer, jika terbentuk endapan berwarna putih maka positif alkaloid. Tabung reaksi III ditetesi dengan pereaksi Dragendorf,

jika terbentuk endapan jingga coklat maka positif alkaloid (Fikayuniar, 2020).

2. Flavonoid

Masukan sampel dan tambahkan air panas beberapa mL kemudian, didihkan dan disaring menggunakan kertas saring hingga didapatkan residu dan filtrat. Kemudian filtrate yang dihasilkan ditambahkan dengan sedikit serbuk Mg, HCl 2N dan amil alcohol. Kemudian kocok kuat dan biarkan hingga memisah. Terbentuknya warna kuning hingga merah menandakan adanya flavonoid (Fikayuniar, 2020).

3. Polifenolat

Masukan sampel dalam tabung reaksi dan dididihkan dalam beberapa mL air, lalu dinginkan dan disaring. kemudian ditambahkan larutan pereaksi FeCl_3 1%. Terbentuknya warna biru-hitam atau hitam kehijauan menandakan adanya polifenolat (Fikayuniar, 2020).

4. Tannin

Masukan sampel dalam tabung reaksi dan dididihkan dalam beberapa mL air, lalu dinginkan dan disaring. Tabung reaksi ditetesi dengan larutan gelatin 1%. Adanya endapan putih menunjukkan positif tanin (Fikayuniar, 2020).

5. Kuinon

Masukan sampel dalam tabung reaksi dan dididihkan dalam beberapa mL air, lalu dinginkan dan disaring. Tabung reaksi ditetesi dengan KOH/NaOH 5%.. Terbentuknya warna jingga hingga merah menandakan positif kuinon (Fikayuniar, 2020).

6. Saponin

Masukan sampel dalam tabung reaksi dan dididihkan dalam beberapa mL air, lalu dinginkan dan disaring. Kemudian dikocok vertical dalam tabung reaksi selama 10-30 detik. Terbentuknya busa ≥ 1 cm setelah diberi 1 tetes asam klorida atau pada pendiaman selama selama lebih kurang 10 menit, menandakan adanya saponin (Fikayuniar, 2020).

7. Triterpenoid dan Steroid

Sampel digerus dengan beberapa mL eter, kemudian dipipet yang sudah disumbat dengan kapas atau disaring menggunakan kertas saring. Kemudian filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering. lalu residu ditetesi dengan 2-3 tetes pereaksi libermann buchard. Terbentuk warna ungu berubah menjadi warna biru menandakan adanya Triterpenoid sedangkan terbentuknya warna merah berubah menjadi warna hijau menandakan adanya steroid (Fikayuniar, 2020).

3.5.7 Aktivitas Antioksidan dengan Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Menggunakan Penampak Bercak DPPH 0,2%

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) mengacu kepada (Yuda, 2017); (Suwarni dan Kadek, 2016) yang dimodifikasi. Tahapannya sebagai berikut ini. Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan pereaksi kimia seperti pereaksi semprot DPPH 0,2% untuk mendeteksi bercak pada uji aktivitas antioksidan. Pemeriksaan dilakukan dengan cara penampak noda yaitu melarutkan DPPH sebanyak 20 mg dalam 10 mL metanol pro analisa. Pengujian dilakukan pada masing-masing ekstrak, yaitu ekstrak N-heksan, etil asetat dan etanol jantung pisang ambon. Pada pengujian ini, ekstrak di totolkan pada lempeng KLT kemudian dielusi menggunakan etil asetat-n heksan (7:3). Selanjutnya diangin-anginkan dan permukaan lempeng disemprot dengan larutan DPPH 0,2 %. Setelah penampak bercak tersebut disemprotkan, pelat disimpan pada tempat yang terlindung dari cahaya selama 30 menit. Dengan adanya aktivitas sebagai radikal bebas ditunjukkan dengan munculnya noda berwarna kuning dengan latar belakang ungu jika dilihat dengan sinar tampak. dan menghitung nilai Rf pada setiap bercak yang teramati. Nilai Rf dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$R_f = \frac{\text{Jarak noda}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

3.5.8 Uji Aktivitas antioksidan menggunakan Metode DPPH

Uji Aktivitas antioksidan menggunakan Metode DPPH mengacu kepada (Noviardi *et al.*, 2020) yang dimodifikasi. Tahapannya sebagai berikut :

1. Pembuatan Larutan DPPH 50 ppm

Menimbang serbuk DPPH sebanyak 5 mg, larutkan dengan metanol pro analisa hingga 100 mL dalam labu ukur (sebelumnya labu ukur sudah dilapisi dengan alumunium foil) kemudian inkubasi selama 30 menit.

2. Pembuatan Larutan Blanko

Memasukan sebanyak 1 mL larutan DPPH 50 ppm, kemudian ditambahkan metanol pro analisa dalam labu ukur 10 mL (sebelumnya labu ukur sudah dilapisi dengan alumunium foil) dan inkubasi selama 30 menit.

3. Pembuatan Larutan Induk Standar Vitamin C 1000 ppm

Larutan pembanding yang digunakan adalah asam askorbat (Vitamin C). Larutan Induk Standar dibuat dengan cara menimbang 2,5 mg asam askorbat (Vitamin C) dan dilarutkan dengan metanol pro analisa dalam labu ukur 50 mL sambil sesekali dikocok. Kemudian ditambahkan metanol pro analisa ad tanda batas.

4. Penentuan Serapan Absorbansi

Memasukan larutan DPPH sebanyak 1 mL dan tambahkan metanol pro analisa 1 mL, lalu inkubasi selama 30 menit, kemudian ukur serapan absorbansi menggunakan Spektrofotometer *UV-Visible* pada panjang gelombang 515 nm dan lakukan secara triplo.

5. Pembuatan Deret Standar Vitamin C

Dibuat deret standar asam askorbat dengan konsentrasi 1; 3; 5; 7; 9 ppm dari larutan induk vitamin C. Setelah didapatkan hasil dipipet dan ditambahkan dengan metanol pro analisa dalam labu ukur 25 mL ad tanda batas. Kemudian masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL dan tambahkan larutan DPPH 1 mL, lalu inkubasi selama 30 menit, kemudian serapan diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan Spektrofotometer *UV-Visible* pada panjang gelombang 515 nm dan lakukan secara triplo.

6. Pembuatan Larutan Uji 1000 ppm

Sampel ekstrak yang digunakan adalah ekstrak kental n-heksana, ekstrak kental etil asetat dan ekstrak kental etanol jantung pisang ambon. Dibuat dengan cara menimbang masing-masing ekstrak sebanyak 100 mg kemudian masing-

masing dilarutkan dengan metanol pro analisa dalam sebuah labu ukur 100 mL sambil sesekali di kocok. Kemudian ditambahkan metanol pro analisa ad tanda batas. Larutan sampel dibuat dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu 50; 75; 100; 125; 150 ppm dan dihitung menggunakan rumus pengenceran. Setelah didapatkan hasil dipipet dan ditambahkan dengan metanol pro analisa dalam labu ukur 10 mL ad tanda batas. Kemudian masing-masing di pipet sebanyak 1 mL dan tambahkan larutan DPPH 1 mL, lalu inkubasi selama 30 menit, kemudian ukur serapan absorbansi menggunakan Spektrofotometer *UV-Visible* pada panjang gelombang 515 nm dan lakukan secara triplo.

7. Pengujian Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

a. Pengukuran aktivitas Antioksidan

Data hasil pengukuran absorbansi digunakan untuk mencari presentase hambatan. Nilai presentase hambatan DPPH dihitung menggunakan rumus, yaitu :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

b. Perhitungan nilai IC₅₀

Pada nilai IC₅₀ menyatakan hubungan antara konsentrasi larutan uji (x) dengan % inhibisi (y). Perhitungan nilai IC₅₀ diperoleh dari persamaan regresi linier sebagai berikut :

$$(y = bx + a)$$

Keterangan :

y = 50 (% hambatan)

x = Konsentrasi IC₅₀

a = intersep

b = slop

3.5.8 Analisis Data

Data dari uji aktivitas antioksidan dianalisis secara kuantitatif menggunakan SPSS. Uji ANOVA ini digunakan untuk melihat perbedaan dari setiap kelompok dan Uji lanjut TUKEY untuk mengetahui lebih lanjut kelompok mana yang signifikan, dengan cara sebagai berikut :

1. Pengujian hipotesis

Ho : tidak terdapat perbedaan signifikan dari kelompok perlakuan

Hi : terdapat perbedaan yang signifikan dari beberapa kelompok perlakuan

2. Pengambilan keputusan

Pengambilan keputusan dilakukan dengan membandingkan hasil statistik. Apabila Asymp.Sig. > 0,05 maka Ho diterima. Artinya tidak ada perbedaan yang signifikan dari beberapa kelompok

perlakuan. Dan jika $Asymp.Sig. < 0,05$ maka H_0 ditolak. Artinya terdapat perbedaan yang signifikan dari beberapa kelompok perlakuan.



3.5.10 Jadwal kegiatan

Tabel 3.2 Jadwal Kegiatan

No	Kegiatan	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08
1	Seminar Proposal										
2	Pelaksanaan penelitian										
3	Pengolahan analisis data										
4	Sidng Tugas Akhir										

