

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui uji efektivitas antioksidan ekstrak etanol 70% biji dan daging buah tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm) menggunakan metode ekstraksi DPPH.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Borneo Lestari Banjarbaru, Kalimantan Selatan pada bulan 12 Mei – 06 Juni 2022

3.3 Variabel Penelitian

Variabel-variabel yang digunakan pada penelitian ini meliputi :

- 1) Variabel bebas : Konsentrasi ekstrak dari pelarut etanol 70%
- 2) Variabel terikat : Efektivitas antioksidan berupa nilai IC₅₀.
- 3) Variabel kontrol : Suhu, kondisi ruangan, panjang gelombang, dan waktu inkubasi

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas seperti labu ukur (*Pyrex*®), gelas ukur (*Pyrex*®), tabung reaksi (*Pyrex*®), gelas beker (*Pyrex*®), pipet tetes, *rotary evaporator*, mikropipet (*Dragon Lab*®), spektrofotometer UV-Vis (*PG Instrument*®), timbangan analitik (*Ohaus*®), kuvet, penangas air, aluminium foil, lampu UV, batang pengaduk, vial, pipa kapiler, bejana KLT dan *stopwatch*.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah biji dan daging buah tandui (*Mangifera rufocostata* Koesterm), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), etanol 70% (*OneMed*®), etanol p.a (*Smart Lab*®), kuersetin, Metanol p.a, etil asetat, n-heksan, plat KLT *silica gel* GF₂₅₄.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengambilan Bahan

Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm) diperoleh dari daerah Desa Paramasan Atas, Kecamatan Paramasan, Kabupaten Banjar. Sampel yang digunakan berupa biji dan daging buah tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm).

3.5.2 Determinasi Biji dan Daging Buah Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm).

Determinasi biji dan daging buah tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm) dilakukan di Laboratorium Dasar Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru.

3.5.3 Pembuatan Simplisia Biji Dan Daging Buah Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm).

Simplisia dibuat dengan cara buah tandui yang segar disortasi basah terlebih dahulu, dipilih buah yang sudah matang dengan memiliki ciri-ciri buah yang berwarna hijau kecoklatan dan memiliki bau yang sangat khas, kemudian buah tandui dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada buah, setelah dicuci hingga bersih ditiriskan. Buah tandui yang telah ditiriskan dikupas, daging buah dipisahkan dengan bijinya lalu dirajang. Biji buah dipisahkan dari batoknya lalu dirajang. Perajangan dilakukan menggunakan pisau menjadi beberapa bagian, setelah itu biji dan daging buah dikeringkan dibawah sinar matahari langsung dengan waktu 3-5 hari untuk mengurangi kadar air pada buah. Biji dan buah yang telah dikeringkan tersebut dilakukan lagi sortasi kering pada simplisia biji dan daging buah tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm) untuk memastikan tidak ada kotoran yang dapat merusak simplisia (Nurviana, 2016; Munawwarah *et al.*, 2017). Setelah simplisia yang

telah dipisahkan dari pengotor, dihaluskan dan diayak menggunakan pengayak 40 mesh. Proses pengayakan menggunakan 40 mesh bertujuan untuk mendapatkan ukuran serbuk yang seragam (Rachman, 2018).

3.5.4 Pembuatan Ekstrak Etanol 70% Biji Dan Daging Buah Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm) dengan Metode Maserasi

Ekstrak biji dan daging buah tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm) dilakukan dengan metode maserasi. Simplisia biji dan daging buah tandui yang sudah menjadi serbuk kering ditimbang pada biji sebanyak 276,29 gram dan pada daging buah tandui sebanyak 90,58 gram, setelah itu dimasukkan kedalam bejana maserasi dan ditambahkan etanol 70% pada wadah berbeda hingga serbuk simplisia terendam sempurna oleh pelarut dengan volume 2 jari diatas serbuk simplisia. Rendam serbuk simplisia selama 1x 24 jam sambil sesekali dilakukan pengadukkan, remaserasi dilakukan sebanyak tiga kali dengan prosedur dan perbandingan jumlah pelarut yang sama. Ekstrak yang sudah jadi lalu disaring sehingga menghasilkan filtrat, filtrat yang didapatkan kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40° C sampai didapatkan ekstrak kental setelah itu diuapkan menggunakan *water bath* hingga didapati bobot yang tetap karena sisa pelarut telah menguap, kemudia dihitung randemen ekstrak dengan rumus (Rachman, 2018; Watama, 2021). :

$$\% \text{ randemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

3.5.5 Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol 70% Biji dan Daging Buah Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) secara kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Plat KLT yang digunakan yaitu plat silika gel GF₂₅₄ pada ukuran 8 cm x 1,5 cm yang telah diberi garis batas dengan jarak 1 cm di bagian bawah dan 0,5 cm dari tepi atas plat dengan menggunakan pensil. Plat diaktifkan terlebih dahulu di dalam oven selama 30 menit dengan suhu 105°C. Ekstrak etanol 70% biji dan daging buah tandui yang digunakan untuk penotolan dimasukkan kedalam *beaker glass* dan dilarutkan dengan etanol p.a (Gandjar, 2016). Kromatografi dilakukan di dalam bejana yang sudah dijenuhkan sebagai fase gerak. Pelarut organik yang terpilih dari hasil optimasi yang digunakan sebagai fase gerak adalah n-heksan : Etil Asetat. Penjenuhan *eluen* dapat dilakukan dengan menempatkan kertas saring ke dalam *chamber* (Rachman, 2018).

Ekstrak biji dan daging buah tandui (*Manifera rufocosta* Kosterm) diambil menggunakan pipa kapiler dan ditotolkan pada plat KLT. Selanjutnya plat KLT dimasukkan kedalam *chamber* yang berisi *eluen* yang sudah dijenuhkan. *Eluen* dibiarkan terelusi hingga mencapai batas plat yang sudah ditandai sebelumnya. Setelah selesai, plat KLT silika gel 60 GF₂₅₄ dikeluarkan dari *chamber* dikeringkan dan setelah itu di semprot dengan larutan DPPH 0,4 mM. Bercak pada KLT

yang mempunyai aktivitas antioksidan akan berubah warna menjadi kuning dengan latar belakang ungu (Nursafitri, 2020).

3.5.6 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Biji dan Daging Buah Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) dengan Metode rendaman Radikal Bebas DPPH.

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM

Larutan DPPH 0,4 mM ini timbang sebanyak 7,89 mg, lalu dilarutkan dengan metanol p.a hingga 50 mL, kemudian masukan kedalam botol gelap. Pelarut dicukupkan hingga tanda batas, lalu digojog hingga homogeny (Saputri *et al.*, 2019).

b. Penetapan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH 0,4 mM

Pengujian ini dilakukan dengan memipet 1 mL larutan DPPH (0,4 mM) dimasukkan ke dalam vial gelap lalu ditambahkan metanol p.a sebanyak 4 mL, larutkan hingga homogen dan dituangkan kedalam kuvet. Panjang gelombang serapan maksimum larutan DPPH ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 450-650 nm (Molyneux, 2004; Putri *et al.*, 2019; Zulfa, 2020).

c. Penentuan *Operating Time*

Pengujian ini dilakukan untuk menentukan *operating time* dengan cara mengambil 1 ml larutan DPPH 0,4 mM dan 4 ml larutan kuersetin 1 ppm. Kemudian dicampurkan dan diukur serapannya

pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dari penentuan panjang gelombang sebelumnya dengan interval 5 menit selama 1 jam. Menit yang menghasilkan absorbansi perendaman radikal bebas DPPH paling stabil merupakan *operating time* (Mulangsri *et al.*, 2017).

d. Pembuatan Larutan Blanko DPPH 0,4 mM

Pengujian ini dilakukan dengan memipet 1 mL larutan DPPH (0,4 mM) dimasukkan kedalam vial, lalu menambahkan metanol p.a sebanyak 4 mL dan dibungkus dengan alumunium foil lalu dihomogenkan dan inkubasi di ruang gelap yang terhindar dari cahaya dan disimpan selama *operating time* yang didapat sebelumnya. Selanjutnya larutan blanko DPPH dimasukkan ke dalam kuvet dan mengukur serapan larutan blanko dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya (Putri *et al* , 2019).

e. Pembuatan Larutan Perbandingan Kuersetin

Pengujian ini dilakukan dengan menimbang kuersetin sebanyak 25 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, lalu melarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas labu ukur 25 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm, kemudian dilakukan pengenceran menjadi 100 ppm, selanjutnya membuat beberapa variasi konsentrasi dari larutan 100 ppm tersebut, yaitu 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm sebanyak 25 mL (Saputri *et al.*, 2019).

f. Pengujian Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding Kuersetin

Pengujian ini dilakukan dengan mengukur masing-masing larutan kuersetin sebanyak 4 mL dan dimasukkan ke dalam vial, kemudian ditambahkan 1 mL larutan DPPH (0,4 mM) kedalam masing-masing vial, inkubasi selama 30 menit dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang sudah ditentukan sebelumnya (Khairiah *et al.*, 2018; Putri *et al.*, 2019; Zulfa., 2020).

g. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Etanol 70% Biji dan Daging Buah Tandui (*Mangifera rufoscotata* Kosterm)

Pengujian ini dilakukan dengan menimbang ekstrak biji Tandui sebanyak 25 mg kemudian dilarutkan dengan metanol p.a, larutan ekstrak biji Tandui dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan dicukupkan sampai tanda batas dengan metanol p.a dan diperoleh 1000 ppm kemudian dilakukan pengenceran ke 100 ppm setelah itu dibuat seri konsentrasi 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm, 2,5 ppm, 3 ppm sebanyak 25 mL. Sedangkan untuk ekstrak daging buah tandui ditimbang sebanyak 25 mg kemudian dilarutkan dengan metanol p.a, larutan ekstrak daging buah Tandui dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan dicukupkan sampai tanda batas dengan metanol p.a dan diperoleh 1000 ppm kemudian dibuat seri konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm sebanyak 25 mL dari larutan induk (Saputri *et al.*, 2019).

h. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji dan Daging Buah Tandui (*Mangifera rufoscotata* Kosterm)

Pengujian ini dilakukan dengan memasukkan masing-masing konsentrasi larutan uji dari masing-masing larutan ekstrak sebanyak 4 mL ke dalam vial dan ditambahkan larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL, kocok hingga tercampur seluruhnya, selanjutnya inkubasi selama 30 menit pada ruang gelap. Serapan dari larutan tersebut diukur pada panjang gelombang yang telah didapatkan dari penentuan panjang gelombang optimum DPPH (Saputri *et al.*, 2019).

3.6 Uji Analisis

3.6.1 Penentuan Nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*) Peredaman Radikal Bebas DPPH

Parameter yang digunakan untuk menginterpretasikan hasil dari uji antioksidan dengan metode DPPH adalah dengan nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi yang menyebabkan hilangnya 50% aktivitas DPPH. Untuk menghitung nilai IC₅₀ diperlukan data dari persen inhibisi. Persen inhibisi dapat dihitung menggunakan rumus (Konda *et al.*, 2020):

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100\%$$

Menentukan nilai IC₅₀ memerlukan persamaan kurva standar dari persen inhibisi sebagai sumbu y dan konsentrasi ekstrak antioksidan sebagai sumbu x. Nilai IC₅₀ dihitung dari masing-masing dengan

menggunakan regresi linier. Konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y dari persamaan $y = bx + a$ (Asvia, 2021).

Rumus yang digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} adalah :

$$IC^{50} = \frac{(50 - a)}{b}$$

Keterangan :

Y : % inhibisi (50)

A : *Intercept* (perpotongan garis disumbu y)

B : *Slope* (kemiringan)

X : Konsentrasi

(Nursafitri, 2020).

Setelah mendapatkan presentase inhibisi, kemudian ditentukan persamaan regresi linier ($y = bx + a$) dimana x adalah konsentrasi dan y adalah persentase inhibisi. Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti $y = 50$. Berikut tabel kategori nilai IC_{50} yang dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 2. Kategori Aktivitas Antioksidan

Besaran IC_{50}	Kategori Aktivitas Antioksidan
< 50 ppm	Sangat kuat
50 – 100 ppm	Kuat
100 – 150 ppm	Sedang
150 – 200 ppm	Lemah
>200 ppm	Sangat lemah