

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan yaitu secara eksperimen yang bertujuan mengetahui aktivitas antioksidan pada cincau hitam. Penelitian meliputi 3 tahapan yaitu tahapan persiapan, tahapan pelaksanaan, dan tahapan akhir. Tahapan persiapan meliputi pengambilan sampel yaitu daun cincau hitam kering, persiapan alat dan bahan yang akan digunakan dalam proses pengujian.

Tahap pelaksanaan meliputi pembuatan simplisia daun cincau hitam kering lalu ekstraksi daun cincau hitam metode rebusan menggunakan pelarut air, kemudian diuapkan menggunakan evaporasi sehingga didapat ekstrak daun cincau hitam. Pengujian antioksidan untuk mengetahui aktivitas antioksidan secara spesifik dari ekstrak daun cincau hitam. Pembuatan cincau hitam dengan variasi waktu yang berbeda dan diuji aktivitas antioksidan pada masing-masing untuk mengukur variasi waktu yang paling optimal menghasilkan antioksidan tertinggi.

Tahap akhir yang meliputi analisis data yang diperoleh berdasarkan hasil penelitian serta pembahasan dan kesimpulan dari aktivitas antioksidan cincau hitam.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah cincau hitam yang sudah divariasikan waktu pemanasan.

3.2.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah sebagian cincau hitam yang sudah diberi perlakuan dengan variasi waktu pemanasan yang berbeda.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Akademi Analis Farmasi dan Makanan Putra Indonesia Malang.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian mulai dari bulan April sampai bulan Juni 2021.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Penelitian ini terdiri atas variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah cincau hitam, sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai IC_{50} pada ekstrak daun cincau hitam. Definisi operasional variabel pada penelitian ini diklasifikasikan sebagai berikut :

Tabel 3.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Sub Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Alat Ukur	Skala Ukur
Cincau hitam	Pemanasan pada waktu 25 menit, 40 menit dan 55 menit	Pembuatan cincau hitam pada waktu 25 menit, 40 menit dan 55 menit		Stopwatch	Rasio
Aktivitas Antioksidan	IC_{50} ekstrak cincau dan cincau sesudah variasi waktu pemanasan	Pengukuran dan perhitungan inhibisi konsentrasi 50% menghambat DPPH	Grafik nilai % inhibisi dibandingkan dengan konsentrasi	Spektrofotometer UV-VIS	Nominal

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian adalah spektrofotometri UV-VIS, kuvet, pipet volume 1 mL, 2 mL, 3 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, dan 25 mL, neraca analitik, rotary evaporator, labu ukur 10 mL, 25 mL, 50 mL, dan 100 mL,

beakerglass, inkubator, vortex, pipet tetes, inkubator, kuvet, batang pengaduk, rak tabung reaksi, tabung reaksi, bola hisap, gelas ukur, panci, kertas saring, aluminium foil, kompor, gas elpiji.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah daun cincau hitam kering, aquadest, serbuk DPPH, etanol, tepung tapioka, air mineral.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Ekstraksi Daun Cincau Hitam Metode Rebusan.

1. Ditimbang simplisia daun cincau hitam sebanyak 10 gram dan dicuci.
2. Dimasukkan dalam panci kemudian ditambahkan dengan 100 ml air sebagai penyari.
3. Dipanaskan di atas kompor hingga mencapai suhu 100°C selama 40 menit atau 3 bagian menjadi 1 bagian, disaring.
4. Dievaporasi hingga menjadi ekstrak daun cincau hitam pada suhu 50°C dengan kecepatan 90 rpm (Anggraini, 2020)

3.6.2 Proses Pembuatan Cincau Hitam

1. Ditimbang 250 g daun cincau hitam kering sebanyak 3x kemudian dilabeli sampel
A : 25 menit
B : 40 menit
C : 55 menit.
2. Dicuci masing-masing sampel A, B dan C.
3. Direbus masing-masing sampel A, B, C dalam 5 liter air sampai mendidih dengan variasi waktu berbeda sampel A 25 menit, B 40 menit dan C 55 menit.
4. Disaring masing-masing sampel menggunakan alat saring untuk memisahkan filtrat dengan ampas.
5. Ditambahkan air 2 liter pada filtrat masing masing sampel dipanaskan kembali dengan variasi waktu berbeda sampel A 25 menit, B 40 menit dan C 55 menit.

6. Ditunggu hingga mendidih lalu ditambahkan tepung tapioka 100g/liter yang sudah dilarutkan ke dalam larutan cincau pada masing-masing sampel kemudian diaduk perlahan agar tidak menggumpal.
7. Dituang adonan ke dalam cetakan kemudian didiamkan hingga terbentuk cincau hitam
8. Diamati organoleptik pada masing-masing sampel meliputi warna, tekstur dan rasa.

3.6.3 Penentuan Nilai IC_{50}

3.6.3.1 Pembuatan larutan DPPH 40 ppm

1. Ditimbang 4 mg serbuk DPPH kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL.
2. Ditambahkan ethanol sampai tanda batas, homogenkan.
3. Diinkubasi pada suhu 35° - 37° C selama 30 menit. (Artanti & Lisnari, 2018).

3.6.3.2 Pembuatan Larutan dan Penentuan Nilai IC_{50} Ekstrak Daun Cincau Hitam.

1. dilarutkan 16 mg ekstrak daun cincau hitam dengan larutan etanol sampai dengan 100 ml sesuai tanda batas sebagai baku induk.
2. Dibuat larutan dengan seri konsentrasi (48, 64, 80, 96 dan 128 ppm) dari baku induk.
3. Dipipet masing-masing konsentrasi sampel 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 2 mL larutan DPPH pada masing-masing konsentrasi.
4. Ditutup dengan alumunium foil, divortex dan diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 35° - 37° C, kemudian serapan dibaca pada panjang gelombang maksimum yang didapat.

3.6.3.3 Preparasi dan Penentuan Nilai IC_{50} Cincau Hitam.

1. Dihancurkan masing-masing sampel A, B, C kemudian disaring diambil filtratnya.
2. Dipipet filtrat sampel A, B, C sebanyak 25 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL.

3. Ditambahkan aquades sampai tanda batas.
4. Dibuat seri konsentrasi dari masing-masing baku induk sampel A, B dan C 75, 100, 125, 150 dan 200 ppm.
5. Dipipet masing-masing seri konsentrasi larutan sampel A, B, C 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
6. Ditambahkan 2 mL larutan DPPH pada masing-masing sampel pada tabung reaksi.
7. Ditutup tabung reaksi dengan aluminium foil, divortex dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 35-37°C.
8. Diuji antioksidan pada cincau hitam. Modifikasi (Miranti dkk, 2016).

Nilai presentase hambatan DPPH dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{serapan blanko} - \text{serapan sampel}}{\text{serapan blanko}} \times 100\%$$

Rumus persamaan regresi linear yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$y = ax + b$$

Keterangan :

y = persentase peredaman

x = konsentrasi

a = gradient

b = konstanta

3.7 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini adalah menentukan nilai IC₅₀ pada variasi waktu pemanasan tahap kedua dengan menghitung standar deviasi, untuk menentukan konsentrasi maksimum dengan menggambar grafik hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi maksimal.