

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan. Tahap pembuatan ekstrak, tahap uji organoleptik, uji kualitatif fitokimia menggunakan pereaksi dan KLT, dan tahap uji secara kuantitatif aktivitas peredaman radikal bebas DPPH menggunakan alat spektrofotometer *UV-Vis*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2021 sampai Juli 2021, di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

C. Populasi dan Sampel

Herba seledri diperoleh di Kecamatan Pakis, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah dengan ketinggian 1.200 mdpl. Seledri diambil pada pagi hari, dipilih seledri hijau segar dengan usia panen \pm 2 bulan.

D. Variabel

1. Variabel bebas berupa perbedaan pelarut ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan.
2. Variabel tergantung berupa IC_{50} tiap ekstrak.
3. Variabel terkontrol berupa waktu panen, waktu pengeringan, suhu, dan tempat tumbuh.
4. Variabel pengacau usia panen, cuaca, dan kelembapan.

E. Definisi Operasional

1. Seledri memiliki aktivitas antioksidan karena mengandung senyawa flavonoid, apiin, kuersetin, apigenin, vitamin A, B, dan C.
2. DPPH adalah sebuah radikal bebas yang diredam oleh senyawa antioksidan dari ekstrak herba seledri.
3. IC_{50} adalah konsentrasi yang dibutuhkan sampel untuk meredam suatu radikal bebas DPPH sebanyak 50%.

F. Alat dan Metode Pengumpulan Data

Pada penelitian ini pengumpulan data dilakukan dengan menguji aktivitas peredaman radikal bebas pada ekstrak herba seledri dengan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH menggunakan alat spektrofotometer *UV-Vis*.

1. Alat

Neraca analitik, seperangkat alat gelas, pipet tetes, toples, centong kayu, blender, seperangkat alat KLT, lampu *UV* 254 nm dan 365 nm, *oven*, *Vortex*, *rotary evaporator*, rak tabung reaksi, sendok tanduk, *hair dryer*, kain penyaring, dan spektrofotometri *UV-Vis*.

2. Bahan

Herba seledri, etanol 96%, etil asetat, n-heksan, vitamin C, DPPH, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Wagner, kain penyaring, metanol pro analisis, HCl, air, kertas saring, alumunium foil, serbuk magnesium, FeCl₃, klorofom, standar kuersetin, asam asetat glasial, formaldehid, dan n-heksan pro analisis.

3. Determinasi Herba Seledri

Determinasi herba seledri (*Apium graveolens* L.), dengan menggunakan daun, batang, dan akar. Tujuannya agar tidak terjadi kesalahan pada saat pengumpulan bahan yang akan digunakan dan memastikan bahwa herba seledri yang digunakan benar dari spesies (*Apium graveolens* L.). Determinasi dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

4. Pembuatan Ekstrak dan Kontrol Kualitas ekstrak

a. Pembuatan Ekstrak

Dilakukan sortasi basah herba seledri untuk memisahkan kotoran-kotoran yang menempel. Dicuci, ditiriskan kemudian sortasi kering untuk menghilangkan kotoran yang masih tertinggal. Dirajang menjadi kecil-kecil kemudian dikeringkan menggunakan *oven* suhu $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$ selama ± 24 jam. Dihaluskan untuk mendapatkan bubuk sampel sebanyak 360 gram serbuk. Dimaserasi herba seledri menggunakan pelarut dengan kepolaran

yang berbeda yaitu etanol 96%, etil asetat dan n-heksan. Setiap pelarut menggunakan masing-masing 120 gram sampel dilarutkan dalam 1,2 liter pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksan. Didiamkan selama 24 jam, disaring untuk memisahkan filtrat dari endapan. Diremaserasi dengan pelarut yang masih baru. Dilakukan penggantian pelarut sebanyak tiga kali dan diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 50°C sehingga memperoleh ekstrak pekat. Ditimbang ekstrak pekat dan dihitung nilai rendemen dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat serbuk simplisia}} \times 100\%$$

b. Kontrol Kualitas Ekstrak

1) Penentuan susut pengeringan

Ditimbang sebanyak 1 gram ekstrak herba seledri lalu dimasukkan ke dalam *moisture balance*. Hasilnya diperoleh data kadar air yang terkandung dalam ekstrak herba seledri.

2) Uji organoleptis

Dilakukan pengujian secara fisik ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan menggunakan indrawi. Dilihat konsistensi, warna, bau, dan rasa.

3) Uji fitokimia

Pengujian fitokimia menurut Djamil *et al.*, (2015) :

a) Alkaloid

Sebanyak 0,25 g ekstrak diencerkan dengan HCL 2 N sebanyak 5 mL kemudian dibagi menjadi 3 tabung. Teteskan pereaksi Dragendorff, hasil positif terbentuk endapan merah bata, hasil positif pereaksi Mayer terbentuk endapan putih, dan hasil positif pereaksi Wagner berwarna cokelat.

b) Identifikasi golongan Flavonoid

Sebanyak 0,25 g ekstrak ditambahkan air 50 mL dan dididihkan 5 menit. Sebanyak 5 mL filtrat ditambahkan magnesium

dan tambahkan 1 mL HCL 2 N. Hasil positif berwarna kuning, jingga hingga ungu.

c) Saponin

Sebanyak 10 mL larutan uji flavonoid masukkan ke dalam tabung reaksi lalu kocok selama 10 menit. Hasil positif terbentuk busa 1-10 cm dan tidak hilang setelah penambahan 1 tetes HCL 2 N.

d) Tanin

Sebanyak 0,25 g ekstrak dididihkan dalam 50 mL air selama 15 menit. Ditambahkan FeCl_3 . Hasil positif tanin berwarna hijau, ungu, merah, biru atau hitam kuat.

e) Steroid dan terpenoid

Sebanyak 0,25 g ekstrak ditambahkan 2 tetes asam asetat glasial dan 1 tetes asam sulfat pekat. Hasil positif berwarna merah atau hijau.

4. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a) Penjenuhan bejana

Dibuat fase gerak dengan menggunakan kloroform : metanol : n-heksan (9:1:1) (Gwtidzo *et al.*, 2018). Dimasukkan kedalam sebuah bejana. Kertas saring 18 cm dimasukkan kedalam bejana. Ditutup rapat bejana dan dibiarkan kertas saring terbasahi oleh fase gerak untuk menandakan bejana telah jenuh (Kusnadi dan Egie, 2017).

b) Pembuatan larutan uji

Ditimbang ekstrak herba seledri sebanyak 5% kemudian dilarutkan masing-masing menggunakan etanol 96%, etil asetat dan n-heksan kemudian divortex (Kemenkes RI, 2017).

c) Prosedur KLT

Dipotong plat KLT sepanjang 10x5 cm, diberi garis 1 cm atas dan bawah plat KLT. Dimasukkan plat KLT ke dalam oven selama 30 menit pada suhu 100°C. Ditotolkan ekstrak herba seledri

dan standar kuersetin pada garis bawah dengan jarak keduanya 1 cm. Setelah bejana yang berisi fase gerak telah jenuh, dimasukkan plat KLT lalu ditutup hingga eluen naik. Dikeringkan plat KLT kemudian diamati noda dibawah sinar *UV* 254 nm dan sinar *UV* 365 nm. Dihitung nilai *R_f* (Kusnadi dan Egie, 2017).

5. Uji Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas Ekstrak Herba Seledri (*Apium graveolens* L.) Terhadap DPPH

Uji aktivitas penangkapan radikal bebas menurut Wulandari *et al.*, (2015) dari ekstrak herba seledri (*Apium graveolens* L.) dilakukan dengan menggunakan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dan vitamin C sebagai pembanding.

a. Pembuatan Larutan DPPH (0,1 mM)

Dibungkus labu ukur menggunakan alumunium foil. Sejumlah 3,9 mg DPPH (BM 394,32) dilarutkan menggunakan metanol pro analisis ditambahkan hingga 100 mL. (Fauzi *et al.*, 2021).

b. Pembuatan Larutan Vitamin C

1) Pembuatan Larutan Induk (Konsentrasi 10 ppm)

Ditimbang 1 mg vitamin C kemudian dilarutkan menggunakan metanol pro analisis ditambahkan hingga 100 mL, dikocok hingga homogen.

2) Pembuatan Larutan Seri Kadar

Dibuat larutan vitamin C dengan berbagai konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, dan 8 ppm. Dipipet masing-masing 20 μ L, 40 μ L, 60 μ L, dan 80 μ L, ditambahkan metanol pro analisis hingga 5 ml lalu dihomogenkan (Wulandari *et al.*, 2015).

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Diambil sebanyak 2 mL larutan DPPH 0,1 mM. Pada spektrofotometer diatur panjang gelombang 400-600 nm agar absorbansi berada pada rentang \pm 0,2-0,8 (Fauzi *et al.*, 2021).

d. Penentuan *Operating Time*

Diambil sebanyak 50 μL vitamin C ditambahkan 4000 μL larutan DPPH 0,1 mM kemudian diukur absorbansinya pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60 pada panjang gelombang maksimal 515 nm (Fauzi *et al.*, 2021).

e. Pembuatan Presisi Standar Vitamin C

Dibuat larutan stok dengan menimbang sebanyak 6 kali vitamin C 8 ppm, diencerkan dalam labu ukur 5 mL kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 515 nm.

f. Pengujian DPPH dan Pembanding Vitamin C

Diambil larutan seri 50 μL dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan 4000 μL DPPH. Ditutup menggunakan alumunium foil didiamkan selama 30 menit, diukur serapannya menggunakan spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang 515 nm (Fauzi *et al.*, 2021).

g. Persiapan Larutan Uji

1) Pembuatan larutan Induk (Konsentrasi 500 ppm)

Ditimbang sejumlah 5 mg masing-masing ekstrak dilarutkan dalam 10 mL metanol pro analisis kemudian kocok hingga homogen (Wulandari *et al.*, 2015).

2) Pembuatan Larutan Seri

Dibuatlah larutan estrak etanol 96%, etil asetat dan n-heksan herba seledri dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm. Dipipet larutan induk sebanyak 50 μL , 100 μL , 250 μL , 500 μL , dan 1000 μL . Dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL, ditambahkan metanol pro analisis hingga tanda batas lalu dihomogenkan (Wulandari *et al.*, 2015).

3) Pengujian DPPH dan Sampel

Dipipet larutan sampel ekstrak herba seledri sebanyak 50 μL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 4000 μL DPPH.

Didiamkan selama 30 menit lalu diukur absorbansi di spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang 515 nm (Fauzi *et al.*, 2021).

h. Perhitungan Nilai IC₅₀

Dihitung nilai IC₅₀ berdasarkan presentase penghambatan terhadap radikal DPPH dari berbagai konsentrasi larutan. Maka didapat sebuah persamaan garis regresi linier $y = a + bx$. Nilai y ganti menjadi 50, sehingga nilai x merupakan nilai IC₅₀.

G. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode penangkapan radikal bebas DPPH. Metode ini merupakan pengujian secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* dengan panjang gelombang 515 nm. Metode ini dipilih karena lebih mudah, waktu cepat, dan sederhana. Hasil absorbansi yang didapatkan digunakan untuk menghitung persen penghambatan.

Perhitungan yang digunakan adalah :

$$\ln \text{ DPPH}(\%) = \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\%$$

Keterangan : A blanko= Absorbansi DPPH tanpa sampel

A Sampel= Absorbansi sampel+DPPH

Analisis data deskriptif kuantitatif digunakan untuk analisis pada penelitian. Membandingkan % penghambatan serapan kosentrasi pada ekstrak etanol, etil asetat, dan n-heksan herba seledri, dan menentukan nilai IC₅₀ menggunakan persamaan regresi linear dengan menggunakan alat spektrofotometer *UV-Vis* sehingga dapat diketahui mana yang memiliki nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang tinggi pada ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan herba seledri.

Tabel 1. Tingkat Kekuatan Antioksidan (Marjoni dan Zulfisa, 2017)

No	Kategori	Nilai IC ₅₀
1	Sangat Aktif	<50 µg/mL
2	Aktif	50-100 /mL
3	Sedang	101-250 µg/mL
4	Lemah	250-500 µg/mL
5	Tidak Aktif	>500 µg/mL

Dilakukan perhitungan statistika ekstrak herba seledri menggunakan aplikasi *Statistical Analysis Software* (SPSS). Menentukan data yang terkumpul terdistribusi normal atau tidak dengan melakukan uji prasyarat yaitu uji normalitas

