

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun tanaman mangga varietas Arumanis (*Mangifera indica* L. var. arumanis )

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun mangga varietas Arumanis (*Mangifera indica* L. var. arumanis) diambil dari bulan Januari 2019 di Kecamatan Tirtomoyo, Kabupaten Wonogiri, Provinsi Jawa Tengah dengan kondisi daun tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun mangga (*Mangifera indica* L.) varietas Arumanis terhadap radikal bebas DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*).

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi diklasifikasikan menjadi variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel terikat.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanolik daun mangga. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah radikal bebas DPPH, alat, kualitas bahan simplisia dan serbuk daun mangga. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah daya antioksidan dari ekstrak etanolik daun mangga.

##### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, mangga adalah daun yang diambil dari Kecamatan Tirtomoyo Kabupaten Wonogiri Provinsi Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak etanol daun mangga adalah ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi daun mangga dengan pelarut etanol 70% selama 5 hari, kemudian dipekatkan dengan *vakum rotary evaporator* 55°C sampai

didapatkan ekstrak pekat daun mangga (*Mangifera indica* L.) varietas Arumanis.

Ketiga, DPPH adalah radikal bebas sintetik yang stabil dalam larutan metanol pro analisa dengan konsentrasi 0,45mM.

Keempat, aktivitas antioksidan adalah kemampuan dari ekstrak etanolik daun mangga varietas Arumanis dalam menangkap radikal bebas DPPH yang dinyatakan dengan nilai IC<sub>50</sub>.

### **C. Bahan dan Alat**

Bahan utama dalam penelitian ini adalah daun mangga (*Mangifera indica* L.) varietas Arumanis yang diambil dari Kecamatan Tirtomoyo, Kabupaten Wonogiri, Provinsi Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%, metanol pro analisa, standart rutin dari Merck dan pereaksi DPPH (*1,1-dyphenyl-2-pikrilhidrazil*) dari Sigma.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah penggiling, botol maserasi, ayakan no. 40, oven, Spektrofotometer UV-Vis (Hitachi-U2900), timbangan analitik (Ohaus PA214), *Vacum Rotary Evaporator* (Heidolph Laborata-4000), Moisture Balance (Ohaus-MB 23), labu takar, gelas ukur dan alat gelas lainnya.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Determinasi tanaman**

Determinasi tanaman dilakukan untuk menetapkan kebenaran tanaman mangga (*Mangifera indica* L.) varietas Arumanis yang berasal dari Kecamatan Tirtomoyo, Kabupaten Wonogiri, Provinsi Jawa Tengah yang akan digunakan untuk penelitian ini adalah benar. Tanaman yang akan diteliti dideterminasi terlebih dahulu.

#### **2. Persiapan bahan**

Tanaman daun mangga diambil dari Kecamatan Tirtomoyo, Kabupaten Wonogiri, Provinsi Jawa Tengah. Tanaman yang diambil adalah daun yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, hijau, sehat, dan tidak berhama. Daun

mangga dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran atau debu yang menempel, dirajang, dan di oven pada suhu 45<sup>0</sup> C selama 3 hari.

Pencucian dilakukan untuk menghilangkan kotoran dan mengurangi mikroba-mikroba yang menempel pada bahan. Pengeringan dilakukan supaya mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, dapat disimpan lebih lama, dan dapat mencegah penurunan mutu simplisia.

### **3. Pembuatan serbuk**

Daun mangga yang sudah kering kemudian diserbukkan dengan cara digiling. Setelah digiling halus serbuk diayak menggunakan pengayak ukuran Mesh 40. Hasil penyerbukan yang berupa serbuk kering disimpan dalam wadah kering dan tertutup.

### **4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun mangga**

Penetapan kadar kelembaban serbuk daun mangga menggunakan alat *moisture balance*. Dengan menimbang serbuk sebanyak 2 gram. Penetapan dengan suhu 105<sup>0</sup>C ditunggu hasilnya sampai muncul angka dalam persen. Pengukuran kelembaban simplisia memenuhi syarat apabila mengandung kadar air kurang dari 10% (Depkes, 2008).

### **5. Pembuatan ekstrak etanol daun mangga**

Menurut Farmakope Herbal Indonesia pembuatan ekstrak dari serbuk kering simplisia dengan cara maserasi menggunakan pelarut yang sesuai. Menggunakan pelarut yang dapat menyari sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk simplisia menggunakan ethanol 70% (Depkes RI, 2008). Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah ethanol 70%. Konsentrasi yang lebih tinggi dari senyawa flavonoid terdeteksi dengan ethanol 70% karena polaritasnya yang lebih tinggi daripada ethanol murni (Tiwari *et al*, 2011).

Serbuk daun mangga sebanyak 500 gram dari berat daun mangga segar yaitu 1,5 kg dimasukkan dalam botol maserasi, ditambah dengan pelarut ethanol 70% sebanyak 3,75 liter dengan perbandingan 1:7,5 botol ditutup kemudian dikocok. Botol yang digunakan berwarna gelap atau coklat. Maserasi dilakukan selama 5 hari dengan beberapa kali penggojokan secara teratur, disimpan pada

suhu ruang dan terhindar dari cahaya matahari. Setelah 5 hari hasil maserasi disaring dengan kain flanel dan kertas saring ditambah 2,5 bagian pelarut ad 10 bagian. Ekstrak cair dipekatkan di *Vacum Rotary Evaporator* pada suhu 55°C sampai diperoleh ekstrak kental kemudian dipekatkan dalam oven dengan suhu 60°C.

## 6. Penetapan susut kering ekstrak daun mangga

Penetapan kadar kelembaban ekstrak daun mangga menggunakan alat *moisture balance*. Dengan menimbang ekstrak sebanyak 2 gram. Penetapan dengan suhu 105°C ditunggu hasilnya sampai muncul angka dalam persen.

## 7. Identifikasi kandungan kimia

**7.1. Identifikasi tannin.** Pengujian kandungan tanin dilakukan terhadap sampel ekstrak yang direaksikan dengan larutan feri klorida 5% (FeCl<sub>3</sub>) sebanyak 3 tetes, amati perubahan warna menjadi biru kehijauan, hijau-biru atau adanya endapan (Mojab, 2003).

**7.2. Identifikasi Flavonoid.** Pengujian kandungan flavonoid dilakukan terhadap 1 ml ekstrak ditambah HCl pekat sebanyak 2 tetes dan dikocok kuat. Setelah itu ditambah serbuk magnesium (Mg) kemudian dilakukan pengocokan kuat. Sampel positif mengandung flavonoid bila mengalami perubahan warna menjadi warna jingga (Huliselan *et al.*, 2015).

**7.3. Identifikasi Saponin.** Sebanyak 1 ml ekstrak etanolik daun mangga dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 5 ml air panas dan ditambahkan 2 tetes HCl 2N dan dikocok kuat. Setelah itu, dilihat apakah terbentuk buih setelah didiamkan selama 10 menit. Sampel positif mengandung saponin bila terdapat buih dengan intensitas yang banyak dan konsisten selama 10 menit (Huliselan *et al.*, 2015).

**7.4. Identifikasi Alkaloid.** Penentuan senyawa alkaloid dimulai dengan penambahan larutan Asam klorida 2N sebanyak 5 mL ke dalam sampel uji, kemudian dipanaskan di atas api bunsen. Setelah itu ditambahkan Reagen Mayer ke dalam campuran tadi. Keberadaan senyawa alkaloid ditandai dengan adanya endapan putih yang terbentuk (Samudra, 2012).

**7.5. Identifikasi Triterpenoid.** Penentuan senyawa triterpenoid dimulai dengan memasukkan 0,5 gram ekstrak ke dalam tabung reaksi ditambahkan 2 ml etanol 70% kemudian diaduk, ditambahkan 1 ml kloroform dan 1 ml asetat anhidra lalu didinginkan, setelah dingin ditambahkan  $H_2SO_4$  pekat. Jika terjadi warna kemerahan, menunjukkan adanya triterpenoid (Mandal dan Ghasal, 2012).

**7.6. Identifikasi Steroid.** Penentuan senyawa steroid dalam ekstrak melalui reaksi sampel uji dengan 2 ml kloroform. Kemudian 2 ml asam sulfat diteteskan lewat dinding tabung reaksi, di dalam lemari asam. Apabila terjadi pembentukan cincin warna merah coklat pada bagian bawah menandai keberadaan steroid (Ghasal, 2012).

## **8. Pembuatan larutan DPPH**

Larutan pereaksi adalah larutan DPPH 0,45 mM dalam pelarut metanol pro analisa. Dibuat dengan menimbang 0,01774 gram serbuk DPPH kemudian dimasukkan dalam labu takar 100 ml, lalu ditambah metanol sampai tanda batas. Sehingga diperoleh konsentrasi 0,45 mM yang dihitung terhadap BM DPPH sebesar 394,32 g/mol.

## **9. Penetapan panjang gelombang maksimal DPPH**

Penentuan panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimal larutan DPPH dilakukan dengan cara 1,0 ml larutan DPPH 0,45 mM ditambah 4,0 ml metanol pro analisa, kemudian dikocok dan diamati serapannya pada rentang 500-530 nm.

## **10. Penentuan *operating time* DPPH**

Larutan stok DPPH 0,45 mM diambil sebanyak 1,0 ml dan ditempatkan dalam vial kemudian ditambah metanol pro analisa 4,0 ml. Penentuan *operating time* dilakukan pada  $\lambda$  517 nm dengan interval waktu menit sampai didapat absorbansi yang stabil, dan tidak terlibat adanya penurunan absorbansi (Purwanto, 2010).

## **11. Uji aktivitas antioksidan**

Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanolik daun mangga (*Mangifera indica* L.) varietas Arumanis dilakukan dengan membagi ekstrak menjadi 5 seri konsentrasi yang pembacaan absorbansinya dilakukan antara 0,2-0,8. Setiap

konsentrasi larutan dipipet sebanyak 4,0 ml kemudian pada masing-masing ditambah 1 ml larutan pereaksi DPPH dalam vial yang tertutup rapat agar terhindar dari cahaya lalu didiamkan dengan waktu pendiaman berdasarkan hasil perhitungan dari *operating time*. Blanko dibuat dengan cara dipipet 4 ml ditambah 1 ml larutan DPPH. Penentuan absorbansinya diamati pada  $\lambda_{\text{maks}}$  yang telah ditentukan sebelumnya.

### E. Analisa Data

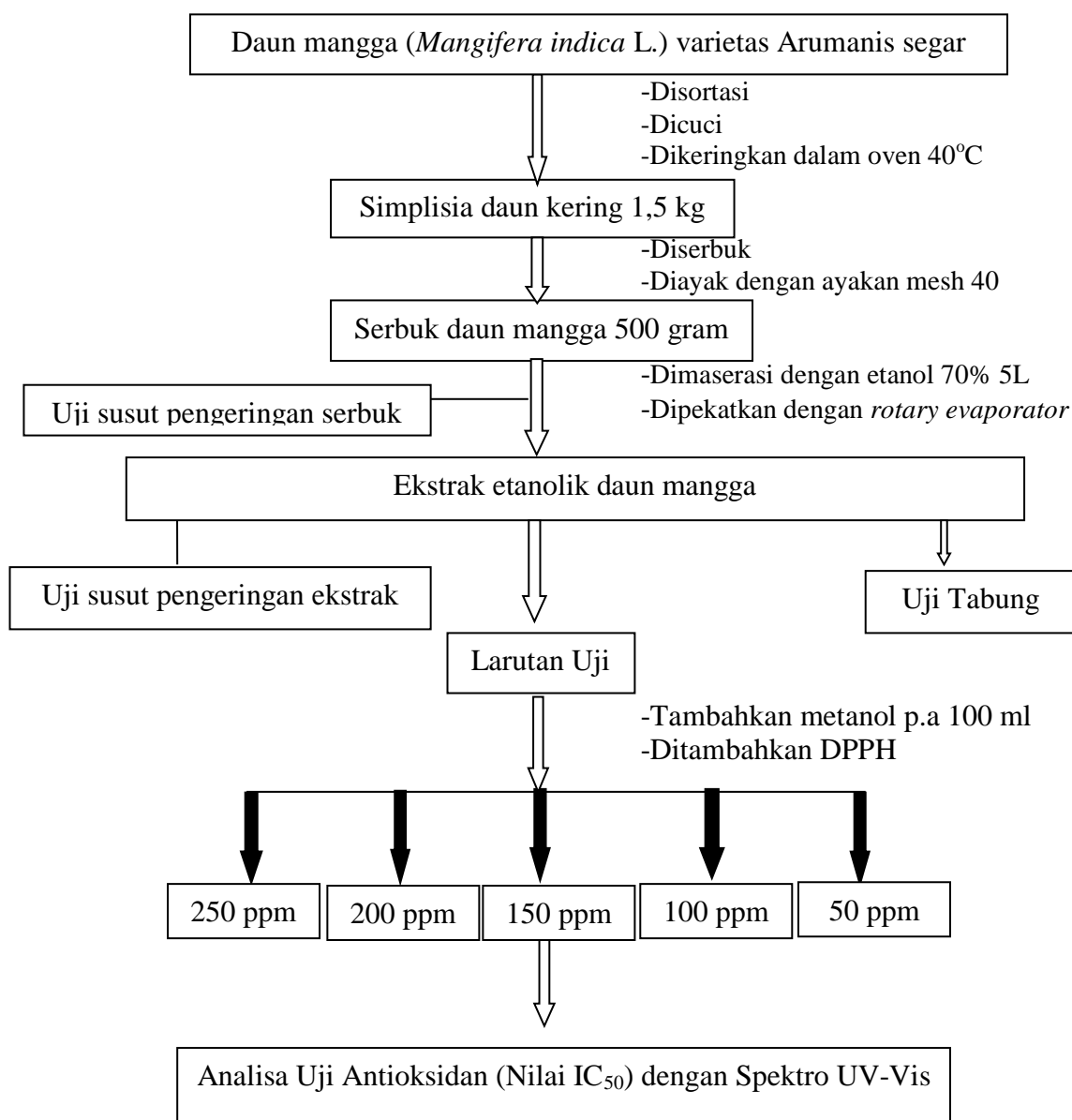
Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase peredaman serapan DPPH dengan menggunakan rumus :

$$\text{Peredaman (\%)} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Setelah didapatkan data yang dibutuhkan, dilakukan perhitungan aktivitas antioksidan radikal bebas DPPH (%) ekstrak etanol dan rutin dihitung dengan metode probit dari persamaan linier ( $y = a+bx$ ) atau dengan persamaan linier ( $y = a+bx$ ) dengan perbandingan antara persentase peredaman ( $y$ ) dengan log konsentrasi ( $x$ ) dan ditentukan  $IC_{50}$  nya.

### F. Skema Jalannya Penelitian

Proses jalannya penelitian uji aktivitas antioksidan ekstrak etanolik daun mangga (*Mangifera indica* L.) varietas arumanis terhadap radikal dpph (*1,1-dyphenyl-2-picrilhidrazil*) dapat dilihat pada skema dibawah ini :



Gambar 3. Skema jalannya penelitian.