

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah buah duku (*Lansium domesticum* Corr.) yang dibeli di toko buah Kecamatan Ngemplak, Boyolali, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah duku berasal dari buah duku yang segar dan sehat, berwarna kuning kecoklatan yang terdapat di toko buah Kecamatan Ngemplak, Boyolali, Jawa Tengah pada Maret 2024.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol kulit buah duku (*Lansium domesticum* Corr.).

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah dilakukan identifikasi diklasifikasikan menjadi variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak metanol kulit buah duku. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah alat, kualitas bahan simplisia dan serbuk kulit buah duku. Variabel tergantung penelitian ini adalah daya antioksidan dan ekstrak metanol kulit buah duku.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, kulit buah duku adalah kulit dari buah duku yang dibeli di toko buah Kecamatan Ngemplak, Boyolali, Jawa Tengah pada bulan Maret 2024.

Kedua, ekstrak metanol adalah ekstrak hasil ekstraksi serbuk kulit buah duku dengan metode maserasi menggunakan campuran pelarut yaitu metanol dan air 30% selama 2 hari kemudian dipekatkan dengan menggunakan alat rotary evaporator pada suhu 40°C.

Ketiga, DPPH adalah suatu senyawa radikal yang digunakan sebagai indikator dalam proses penetapan senyawa antioksidan dan untuk menghambat adanya radikal bebas.

Keempat, aktivitas antioksidan adalah suatu kemampuan dari ekstrak metanol kulit buah duku untuk menangkap radikal bebas DPPH yang dilakukan dengan menentukan nilai IC₅₀.

C. Bahan dan Alat

Bahan utama dalam penelitian ini adalah kulit buah duku yang dibeli di toko buah Kecamatan Ngemplak, Boyolali, Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan adalah metanol p.a, asam askorbat (vitamin C) dan pereaksi DPPH (*1,1 diphenyl-2-picrilhidrazil*). Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, botol, ayakan no.40, oven, spektrofotometer UV-Vis, timbangan analitik, rotary evaporator, moisture balance, pipet volume, labu takar, kertas saring, corong, beaker glass, gelas ukur, batang pengaduk, dan alat lainnya.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi Tanaman Duku

Identifikasi tanaman duku pada bagian buah dilakukan untuk menetapkan kebenaran buah duku yang dibeli di toko buah Kecamatan Ngemplak, Boyolali, Jawa Tengah yang akan digunakan untuk penelitian ini. Buah yang akan diteliti dilakukan identifikasi di Universitas Setia Budi terlebih dahulu.

2. Persiapan Bahan

Kulit buah duku yang berasal dari buah duku yang dibeli di toko buah Kecamatan Ngemplak, Boyolali, Jawa Tengah. Kulit buah duku yang diambil adalah kulit buah duku yang sehat, yang berwarna kuning kecoklatan, dan tidak berhama. Buah duku dikupas dan diambil kulitnya, kulit buah duku dicuci dengan bersih untuk menghilangkan kotoran atau debu yang menempel, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C.

3. Pembuatan Serbuk

Kulit buah duku yang sudah kering kemudian diserbuk dengan cara digiling kemudian diayak dengan menggunakan pengayak ukuran mesh no 40. Hasil kulit buah duku yang sudah berupa serbuk kering kemudian disimpan dalam wadah tertutup agar tidak tercemar debu atau kotoran.

4. Penetapan Susut Pengerinan Serbuk Kulit Buah Duku

Penetapan susut pengerinan dilakukan dengan cara serbuk kulit buah duku ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian dilakukan pengujian dengan alat *moistrue balance* dengan replikasi 3 kali (Depkes, 2007).

5. Ekstraksi

Hari pertama serbuk kulit buah duku sebanyak 300 gram dimasukkan ke dalam botol maserasi, ditambah dengan pelarut metanol

sebanyak 3 liter, botol ditutup kemudian merendam selama 24 jam. Setelah 24 jam, hasil maserasi disaring dengan kain flanel dan kertas saring didapatkan filtrat pertama. Hari kedua, ampas ditambahkan metanol sebanyak 1,5 liter, kemudian merendam selama 24 jam. Setelah 24 jam, disaring dengan kain flanel dan kertas saring didapatkan filtrat kedua. Filtrat 1 dan 2 digabung, kemudian dilakukan evaporasi dengan menggunakan alat evaporator dan selanjutnya dimasukkan ke dalam gelas kosong yang sudah ditimbang terlebih dahulu untuk tempat ekstrak, kemudian dipekatkan di *water bath* atau oven sampai didapatkan ekstrak yang pekat.

6. Uji Skrining Fitokimia Uji Tabung

Uji fitokimia meliputi uji alkaloid, uji flavonoid, uji tanin, uji steroid, uji triterpenoid dan uji saponin. Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak metanol kulit buah duku (*Lansium domesticum* Corr.).

6.1 Uji Alkaloid. Sebanyak 0,2 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan kloroform secukupnya, selanjutnya ditambahkan 5 mL amonia dan 5 mL kloroform lalu ditambahkan 10 tetes H_2SO_4 2N. Campuran dikocok dan dibiarkan hingga membentuk 2 lapisan. Lapisan atas dipindahkan dalam 3 tabung reaksi dengan volume masing-masing 1 mL. Kemudian masing-masing tabung tersebut ditambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff. Apabila terbentuk endapan menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid, dengan pereaksi Mayer memberikan endapan putih, dengan pereaksi Wagner memberikan endapan berwarna coklat dan pereaksi Dragendorff memberikan endapan berwarna jingga (Samudra, 2012).

6.2 Uji Flavonoid. Sebanyak 0,2 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 mL etanol dan dipanaskan selama 5 menit dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan beberapa tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 gram serbuk Mg. Adanya flavonoid ditunjukkan oleh timbulnya warna merah tua (Huliselan et al., 2015).

6.3 Uji Tanin. Sebanyak 0,2 gram ekstrak ditambahkan dengan etanol secukupnya. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan $FeCl_3$ 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau (Mojab, 2003).

6.4 Uji Steroid dan Triterpenoid. Sebanyak 0,2 gram ekstrak ditambahkan CH_3COOH glasial secukupnya, dibiarkan selama 15 menit kemudian 6 tetes larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes H_2SO_4 pekat. Adanya triterpenoid ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi warna merah atau ungu, sedangkan steroid ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi warna biru atau hijau (Ghosal, 2012).

6.5 Uji Saponin. Sebanyak 0,2 gram ekstrak ditambahkan dengan akuades secukupnya kemudian dididihkan 2-3 menit. Selanjutnya didinginkan dan dikocok kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil (Huliselan et al., 2015).

7. Uji Antioksidan

Uji antioksidan dilakukan dengan beberapa tahapan sebagai berikut :

7.1 Pembuatan Larutan Induk DPPH 0,4 mM. Serbuk DPPH sebanyak 15,8 mg ditimbang dengan seksama, kemudian serbuk DPPH yang sudah ditimbang dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas pada labu takar 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 0,4 mM yang dihitung terhadap BM DPPH sebesar g/mol.

7.2 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum DPPH. Penentuan panjang gelombang (α) maksimal larutan DPPH dilakukan dengan cara 1,0 mL larutan DPPH 0,4 mM dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL ditambahkan metanol p.a ad 5 mL, kemudian dikocok dan diamati serapannya pada rentang 500-530 nm.

7.3 Penentuan *Operating Time*. *Operating time* DPPH dilakukan dengan larutan stok DPPH 0,4 mM diambil sebanyak 1,0 mL dan ditempatkan dalam labu takar 5 mL kemudian ditambah dengan metanol p.a sampai tanda batas. Penentuan *operating time* dilakukan pada α 515 nm dengan interval waktu tiap menit selama 60 menit sampai didapat absorbansi yang stabil, dan tidak terlihat adanya penurunan absorbansi.

Operating time ekstrak metanol kulit buah duku dengan menimbang 10 mg ekstrak kulit buah duku ditambah 10 mL metanol p.a dibuat dalam 1000 ppm, kemudian dilakukan pengenceran menjadi 100 ppm dengan perbandingan 1 : 1 dan diambil 1 mL DPPH ditambah 1 mL larutan uji kemudian ad 5 mL metanol p.a.

Operating time vitamin C dengan penimbangan 10 mg vitamin C ditambah 10 mL metanol p.a, dibuat dalam 1000 ppm, kemudian

dilakukan pengenceran 2 kali dari 100 ppm menjadi 1 ppm dengan perbandingan 2 : 2 ad 10 mL metanol p.a (Purwanto, 2010).

7.4 Pembuatan Larutan Blanko. Dipipet 2 mL larutan DPPH 40 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan metanol p.a sebanyak 1 mL, lalu diinkubasi selama 15 menit. Kemudian serapan larutan blanko diukur pada panjang gelombang maksimum 515 nm (Selvia, 2017).

7.5 Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Metanol Kulit Buah Duku 1000 ppm. Sebanyak 0,1 gram ekstrak metanol kulit buah duku dilarutkan dalam metanol p.a, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL lalu ditambahkan metanol p.a sampai tanda garis, kemudian larutan dikocok sampai homogen (Selvia, 2017).

7.6 Pembuatan Seri Konsentrasi Ekstrak Metanol Kulit Buah Duku. Dari larutan induk ekstrak metanol kulit buah duku 1000 ppm dipipet sebanyak 0,5, 1, 1,5, 2, dan 2,5 mL, lalu dimasukkan ke dalam masing-masing labu ukur 10 mL dan ditambahkan pelarut metanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm. Larutan uji ekstrak metanol kulit buah duku dengan masing-masing seri konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm dipipet sebanyak 2 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10 mL dan ditambahkan larutan DPPH sebanyak 2 mL, kemudian ditambah metanol p.a sampai tanda batas. Kemudian diukur serapan masing-masing larutan pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Selvia, 2017).

7.7 Pembuatan Larutan Induk Vitamin C 1000 ppm. Preparasi baku vitamin C sebagai larutan pembanding, sebanyak 0,1 gram baku vitamin C dilarutkan dalam metanol p.a, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL lalu ditambahkan metanol p.a sampai tanda garis, kemudian larutan dikocok sampai homogen (Selvia, 2017).

7.8 Pembuatan Seri Konsentrasi Vitamin C. Dari larutan induk vitamin C 1000 ppm dipipet sebanyak 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, dan 0,5 mL, lalu dimasukkan ke dalam masing-masing labu ukur 10 mL dan ditambahkan pelarut metanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm (Selvia, 2017). Larutan vitamin C dengan masing-masing seri konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dipipet sebanyak 2 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10 mL dan ditambahkan larutan DPPH sebanyak 2 mL, kemudian ditambah

metanol p.a sampai tanda batas. Kemudian diukur serapan masing-masing larutan pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Selvia, 2017).

7.9 Preparasi Sampel. Kulit buah duku dibersihkan dan dioven pada suhu 50°C sampai kering. Sampel kulit buah duku yang sudah kering, kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender sehingga diperoleh sampel dalam bentuk halus. Sampel yang sudah dihaluskan kemudian diayak dengan ayakan no.40 dan diekstraksi menggunakan metode maserasi. Serbuk kulit buah duku sebanyak 200 gram dimasukkan ke dalam botol maserasi, ditambah dengan pelarut etanol 96% sebanyak 2 liter botol ditutup kemudian rendam selama 24 jam. Setelah 24 jam, hasil maserasi disaring dengan kain flanel dan kertas saring didapatkan filtrat pertama. Hari kedua, ampas ditambahkan etanol 96% sebanyak 1 liter, kemudian rendam selama 24 jam. Setelah 24 jam, disaring dengan kain flanel dan kertas saring didapatkan filtrat kedua. Filtrat 1 dan 2 digabung, kemudian dilakukan evaporasi dengan menggunakan alat evaporator dan selanjutnya dimasukkan ke dalam gelas kosong yang sudah ditimbang terlebih dahulu untuk tempat ekstrak, kemudian dipiekatkan di water bath atau oven sampai didapatkan ekstrak yang pekat.

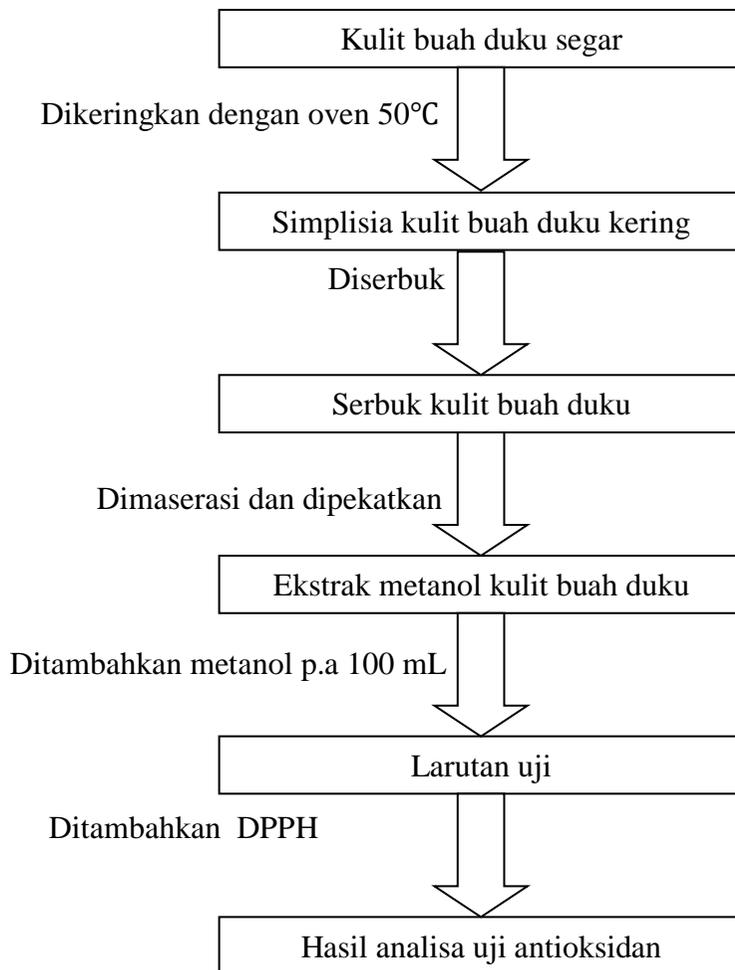
Proses filtrasi tersebut berlangsung lama, karena ekstrak kulit buah duku yang diperoleh cukup kental sehingga perlu diaduk dengan pelan agar filtrat dapat tersaring dengan sempurna. Pengadukan dengan tekanan yang cepat pada proses penyaringan akan menyebabkan kertas saring sobek sehingga proses penyaringan harus diulangi kembali, karena kemungkinan ada residu yang masuk kedalam filtrat yang telah dihasilkan sebelumnya.

E. Analisis Hasil

Aktivitas penangkap radikal bebas DPPH dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

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

Setelah didapatkan data tersebut, dilakukan perhitungan aktivitas antioksidan radikal bebas DPPH (%) ekstrak metanol kulit buah duku dan vitamin C dengan metode probit dari persamaan linier dan ditentukan nilai IC₅₀nya.



Gambar 2. Skema jalannya penelitian