

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang akan digunakan adalah eksperimen laboratorium untuk mengetahui aktivitas antioksidan tertinggi pada formulasi teh kombinasi kulit buah salak dengan daun stevia dengan menggunakan metode DPPH (1,1- diphenyl-2- pycrilhdrazil) secara spektrofotometer UV- Vis).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang, terletak di Jl. Besar Ijen No.77C, Oro-oro Dowo, Kec. Klojen, Kota Malang, Jawa Timur 65119.

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 Alat

Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah beaker glass, kaca arloji, labu ukur, spatula, batang pengaduk, pipet tetes, botol gelap, vial, oven, cawan kursibel, desikator, mikropipet, pipet ukur, shaker, Erlenmeyer, pipet volume, dan spektrofotometer UV- Vis.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah salak (*Salacca zalacca*), daun stevia (*stevia rebaudina*), larutan DPPH (1,1- diphenyl-2- pycrilhydrazil), rosella, jahe, Metanol p.a, kantong teh celup kosong, kertas saring, akuades.

3.4 Populasi dan Sampling

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah salak (*Salacca zalacca*), daun stevia (*stevia rebaudina*) dari wilayah Kecamatan Singosari, Kabupaten Malang.

3.4.2 Sampling Penelitian

Sampel yang diambil pada penelitian ini adalah kulit buah salak (*Salacca zalacca*), daun stevia (*stevia rebaudina*) yang sudah melewati tahap pengolahan,

kemudian dihaluskan dan dibuat menjadi 4 formulasi dan dikemas dalam bentuk teh celup.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahan atau timbulnya dependen (terikat) (Sugiono, 2017). Adapun variabel bebas penelitian ini adalah variasi formulasi pada teh kombinasi kulit buah salak (*Salacca zalacca*), daun stevia (*stevia rebaudina*).

3.5.2 Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel dependen merupakan variabel konsekuensi, kriteria, dan output. Variabel dependen juga disebut sebagai variabel terikat. Adanya variabel terikat dapat menjadi akibat dan pengaruh bagi variabel tersebut (Sugiono, 2013). Adapun variabel terikat dari penelitian ini adalah aktivitas antioksidan, dan organoleptik.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Metode Ukur	Skala Ukur
1.	Variasi Formulasi	Kulit buah salak dan daun stevia diolah menjadi dalam bentuk teh celup dengan 4 formulasi	-	Nominal
2.	Aktivitas Antioksidan	Kemampuan suatu senyawa yang menghambat reaksi oksidasi yang dapat dinyatakan dengan % inhibisi (persentase kemampuan sampel	Uji DPPH	Rasio

		dalam menangkap radikal DPPH) yang diukur menggunakan alat spektrofotometer Uv-vis		
--	--	--	--	--

3.7 Metode Penelitian

Metode penelitian dimulai dengan pembuatan simplisia, uji kadar air, pembuatan formulasi dan penentuan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH. Target atau indikator keberhasilan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah adanya korelasi uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Berikut metode masing-masing tahapan dalam penelitian ini:

3.7.1 Pembuatan Simplisia dan Serbuk Kulit Salak

Kulit Salak disortasi basah terlebih dahulu, dipisahkan kulit dari buahnya, lalu cuci dengan air mengalir dan tiriskan. Selanjutnya dilakukan pengeringan dengan menggunakan metode pemanasan dengan oven dengan suhu 70 derajat celsius selama 2 jam. Kulit salak yang sudah kering kemudian disortasi kering untuk menghilangkan pengotor. Selanjutnya dilakukan penyerbukan menggunakan grinder. Untuk menentukan ukuran serbuk kulit salak disaring dengan mesh ukuran 30 – 50.

3.7.2 Pembuatan Simplisia dan Serbuk Daun Stevia

Daun stevia disortasi basah terlebih dahulu, memisahkan daun yang telah layu dan menghitam, lalu cuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Selanjutnya dilakukan pengeringan dengan menggunakan metode pemanasan dengan oven dengan suhu 70 derajat celsius selama 2 jam. Daun stevia yang sudah kering kemudian dilakukan sortasi kering untuk memisahkan pengotor, setelah itu dilakukan penyerbukan menggunakan grinder. Untuk menentukan ukuran serbuk daun stevia disaring dengan mesh ukuran 30 – 50.

3.7.3 Pembuatan Simplisia dan Serbuk Jahe

Jahe disortasi basah terlebih dahulu, lalu cuci dengan air mengalir. Setelah itu dilakukan perajangan secara tipis. Selanjutnya dilakukan pengering dengan

menggunakan metode pemanasan dengan oven dengan suhu 70 derajat celsius. Jahe yang sudah kering kemudian di sortasi kering menghilangkan pengotor yang menempel. Setelah itu dilakukan penyerbukan menggunakan grinder. Untuk menentukan ukuran serbuk jahe disaring dengan mesh ukuran 30 – 50.

3.7.4 Pembuatan Simplisia dan Serbuk Rosella

Rosella disortasi basah terlebih dahulu, lalu cuci dengan air mengalir. Setelah dicuci kemudian tiriskan dan dikeringkan dengan menggunakan metode pemanasan dengan oven dengan suhu 70 derajat celsius. Rosella yang sudah kering kemudian dilakukan penyerbukan menggunakan grinder. Setelah itu, Untuk menentukan ukuran serbuk kulit salak disaring dengan mesh ukuran 30 – 50.

3.7.5 Kadar Air

Pengukuran kadar air dilakukan cara menimbang botol timbang yang akan digunakan selama 30 menit untuk menghilangkan uap air yang tertinggal. Dinginkan dalam desikator, kemudian ditimbang masing-masing sampel sebanyak 5 gram pada botol timbang yang telah diketahui bobotnya. Kemudian dioven pada suhu 100-105°C selama 4 jam lalu didinginkan pada desikator. Ditimbang bobot akhir setelah pengovenan. Diulang hingga dicapai bobot konstan.

3.7.6 Pembuatan Formulasi Teh

Serbuk kulit salak dan daun stevia dicampur dan ditambahkan dengan bahan tambahan rosella dan jahe. Sehingga diperoleh total berat sebanyak 3 gram bubuk kombinasi kulit salak, daun stevia, rosella, dan jahe yang kemudian dimasukkan ke dalam kantong teh celup.

Kantong teh yang akan digunakan harus kuat, tidak mudah robek, dalam keadaan baik, bersih, dan memiliki standar food grade sehingga aman bagi kesehatan konsumen. Pada penelitian ini digunakan kantong teh yang khusus untuk pembuatan teh celup dan hasil yang diperoleh adalah baik dan aman bagi kesehatan sesuai dengan standar SNI dan tidak robek saat diseduh (terkena air panas) dan terbuat dari bahan polistiren.

Tabel 3. 2 Formulasi Bubuk Teh Celup Kombinasi

Sampel	Keterangan
S1	61,6% kulit salak : 5% stevia : 6,7% jahe : 26,7% rosella
S2	60% kulit salak : 6,6% stevia : 13,4% jahe : 20% rosella
S3	58,3% kulit salak : 8,3% stevia : 20% jahe : 13,4% rosella
S4	56,6% kulit salak : 10% stevia : 26,7% jahe : 6,7% rosella

3.7.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode Blois (1958). Persen peredaman ditentukan dengan menghitung persentase penurunan absorbansi DPPH. IC_{50} (*Inhibitory concentration 50 %*) peredaman DPPH dapat dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi.

A. Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 10 mg DPPH ditimbang, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 250 ml dan dimasukkan pelarut methanol p.a hingga tanda batas lalu dihomogenkan. Labu ukur ditutup dengan aluminium foil agar terhindar dari cahaya.

B. Pembuatan Larutan Sampel

Sebanyak 25 mg bahan ditimbang kemudian ditambahkan 25 ml methanol p.a homogenkan.

C. Penentuan Panjang Gelombang (λ) Maksimum DPPH

Larutan DPPH sebanyak 1 ml dipipet ke dalam vial kemudian dicukupkan volumenya hingga 10 ml dengan methanol p.a, dihomogenkan kemudian dibiarkan selama 30 mnt, selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm memakai spektrofotometri UV-Visibel dan panjang gelombang maksimum DPPH yaitu 517 nm

D. Pengukuran Kadar Antioksidan

Sampel Pengujian dilakukan dengan cara memipet 100, 200, 300, 400 dan 500 μ l dari larutan stok sampel. Sampel ditambahkan 1 ml DPPH dan dicukupkan dengan methanol p.a hingga 5 ml. Selanjutnya dihomogenkan

dan dibiarkan hingga 30 menit. Lalu diukur dengan panjang gelombang 517 nm. Dilakukan sebanyak 2 replikasi. Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persen inhibisi yang dihitung dengan rumus :

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}}$$

Keterangan :

A blanko = Absorbansi DPPH + methanol

A sampel = Absorbansi DPPH + sampel

Setelah didapatkan % aktivitas antioksidan, kemudian dicari nilai IC₅₀ sampel dengan cara membuat grafik linear, hubungan antara konsentrasi sampel (x) dengan % aktivitas antioksidan sampel (y), sehingga didapatkan persamaan regresi linearnya (y=ax+b). Nilai IC₅₀ didapatkan dengan mengganti nilai y dengan angka 50.

3.8 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

Aktivitas antioksidan teh kombinasi kulit buah salak dan daun stevia dari Formulasi 1,2, 3 dan 4 dengan masing-masing konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm diuji terhadap radikal bebas DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) menggunakan metode spektrofotometer uv-vis. Data absorbansi yang diperoleh dilakukan perhitungan % inhibisi sebagai nilai konsentrasi perhitungan nilai IC₅₀. Data-data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel untuk mempermudah menentukan formulasi teh kulit buah salak dan daun stevia dengan penambahan jahe dan rosella yang memiliki nilai aktivitas terbaik dalam bentuk IC₅₀.