

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah non eksperimental dengan desain komparatif yaitu untuk mengetahui perbandingan aktivitas antioksidan pada seduhan daun dan bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) dengan spektrofotometer UV-Vis.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2024 di Laboratorium Analisis Farmasi dan Makanan Poltekkes Kemenkes Malang.

#### **3.3 Alat dan Bahan**

##### **3.3.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven *MEMMERT*, loyang, penjepit, grinder *GETRA 1C-06B*, toples, spatula, neraca analitik *OHAUS PX244E*, kaca arloji, beaker gelas 50 ml, 100 ml dan 250 ml, gelas ukur 100 ml, hot plate *taffware*, batang pengaduk, corong, pipet tetes, pipet volume 2 ml, pipet ukur 10 ml, bola pump, mikropipet, yellow tip 10-200 $\mu$ l, labu ukur 5 ml dan 100 ml, vial gelap, kuvet, dan spektrofotometer UV-Vis *SHIMADZU 752N*.

##### **3.3.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cengkeh, bunga cengkeh, aquadest, metanol p.a (Merck), larutan DPPH, kertas saring dan aluminium foil.

#### **3.4 Variabel Penelitian**

##### **3.4.1 Variabel bebas**

Variabel bebas (*Independent Variable*) merupakan variabel yang menjadi sebab akibat atau mempengaruhi suatu perubahan atau timbulnya variabel terikat (*dependent*) (Sugiyono, 2015). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah seduhan daun dan bunga cengkeh.

##### **3.4.2 Variabel terikat**

Variabel terikat (*Dependent Variable*) merupakan variabel yang menjadi sebab akibat atau dipengaruhi karena adanya variabel bebas (*independent*)

(Sugiyono, 2015). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah perbandingan aktivitas antioksidan seduhan daun dan bunga cengkeh dan organoleptik

### 3.5 Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3.1 Definisi Operasional**

No	Variabel penelitian	Definisi (batasan)	Metode dan alat pengukuran	Skala ukur	Indikator hasil pengukuran
1.	Seduhan daun dan bunga cengkeh	Larutan yang dihasilkan dari proses mengekstrak senyawa kimia atau rasa dari serbuk daun dan bunga cengkeh dengan air panas	Penyeduhan mg serbuk menggunakan ml air mendidih	Interval	Konsentrasi seduhan
2.	Aktivitas antioksidan	Aktivitas antioksidan yaitu kemampuan suatu senyawa menghambat reaksi oksidasi yang ditunjukkan dengan nilai konsentrasi inhibisi 50% (IC <sub>50</sub> )	Uji DPPH menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	Rasio	Nilai IC <sub>50</sub> seduhan daun dan bunga cengkeh

### **3.6 Prosedur Penelitian**

#### **3.6.1 Pembuatan Simplisia Daun Dan Bunga Cengkeh**

Daun dan bunga cengkeh masing-masing sebanyak 500 gram diperoleh dengan pemetikan secara langsung dari Desa Kalipucang, Kecamatan Tukur, Kabupaten Pasuruan kemudian dicuci dengan air mengalir. Daun cengkeh dilayukan selama 3 hari sedangkan bunga cengkeh selama 7 hari. Selanjutnya dilakukan pengeringan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 120 menit. Daun dan bunga cengkeh yang telah kering diserbukkan menggunakan grinder (Rauf dkk., 2017).

#### **3.6.2 Pembuatan Seduhan Daun dan Bunga Cengkeh**

Ditimbang masing-masing simplisia sebanyak 100 mg kemudian dimasukkan ke dalam beaker gelas 100 ml berbeda. Simplisia diseduh dengan air sebanyak 100 ml lalu hingga homogen dan didiamkan selama 10 menit. Hasil seduhan disaring menggunakan kertas saring dan corong. Diperoleh filtrat larutan induk sampel daun dan bunga cengkeh masing-masing 1000 ppm (Guru & Santoso, 2018).

#### **3.6.3 Pembuatan Larutan Seri Seduhan Daun Dan Bunga Cengkeh**

Filtrat seduhan daun dan bunga cengkeh 1000 ppm masing-masing dipipet sebanyak 50  $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 150  $\mu$ L, 200  $\mu$ L dan 250  $\mu$ L ke dalam labu ukur 5 ml yang berbeda. Dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas dan dikocok homogen. Diperoleh konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm. Dibuat 3 replikasi.

#### **3.6.4 Pembuatan Larutan Induk DPPH (Tristantini dkk., 2016)**

Padatan DPPH ditimbang sebanyak 5 mg lalu dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml yang sebelumnya telah dibungkus menggunakan aluminium foil. Dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas lalu dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan induk DPPH 50 ppm. Pembuatan larutan induk DPPH harus secara cepat dan menghindari cahaya.

#### **3.6.5 Pembuatan Larutan Kontrol**

Larutan induk DPPH 50 ppm dipipet sebanyak 2 ml ke dalam vial gelap kemudian ditambahkan 2 ml metanol p.a. Larutan dikocok perlahan hingga homogen kemudian diinkubasi selama 30 menit ditempat gelap.

### 3.6.6 Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

Masing-masing larutan seri sampel 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm dipipet sebanyak 2 ml kedalam 2 ml larutan induk DPPH 50 ppm dalam vial gelap berbeda kemudian dikocok hingga homogen. Masing-masing larutan uji yang telah dibuat diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam keadaan gelap. Absorbansi larutan blanko dan setiap larutan uji diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Absorbansi yang diperoleh dicatat lalu dihitung persen hambat masing-masing larutan dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibis} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100 \%$$

Nilai IC<sub>50</sub> sampel ditentukan dengan membuat grafik linier hubungan antara konsentrasi sampel (x) dengan %inhibisi (y).

### 3.6.7 Uji Organoleptik

Uji organoleptik pada penelitian ini menggunakan uji efektif dengan skala hedonik (kesukaan). Penilaian organoleptik dengan uji hedonik merupakan jenis uji penerimaan dimana panelis diminta memberikan tanggapan kesukaan atau ketidaksukaan terhadap rasa, warna, aroma dan daya terima keseluruhan seduhan daun dan bunga cengkeh (Setyaningsih dkk., 2010).

Untuk panelis yang digunakan pada penelitian ini adalah panelis tidak terlatih sebanyak 30 orang. Sampel yang diujikan adalah seduhan daun dan bunga cengkeh dengan perbandingan serbuk daun dan bunga cengkeh masing-masing (mg): air (ml) 5:100 (50 ppm). Panelis diminta mencicipi dan mengevaluasi sampel kemudian memberikan penilaian berdasarkan skala hedonik berikut:

**Tabel 3.2 Skala Uji Hedonik**

Skala Hedonik	Skala Numerik
Amat sangat suka	6
Sangat suka	5
Suka	4
Cukup suka	3
Tidak suka	2
Sangat tidak suka	1

(Sofiah & Achyar, 2008)

### 3.6.8 Instrumen Uji Organoleptik

#### Lembar Uji Organoleptik

Nama:

Jenis kelamin:

Prosedur:

1. Panelis diminta mencicipi sampel seduhan dengan kode A dan B yang telah disediakan
2. Sebelum dan sesudah mencicipi masing-masing sampel, panelis diminta meminum air putih untuk menetralkan lidah
3. Panelis memberikan penilaian terhadap rasa, aroma, dan warna berdasarkan nilai skor 6-1

Uji hedonik	Sampel A	Sampel B
Rasa		
Aroma		
Warna		

Skor penilaian: 6 = Amat sangat suka  
5 = Sangat suka  
4 = Suka  
3 = Cukup suka  
2 = Tidak suka  
1 = Sangat tidak suka

### 3.7 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini adalah deskriptif kuantitatif dan kualitatif yaitu dengan cara menganalisis data hasil uji aktivitas antioksidan dan hasil uji organoleptik seduhan daun dan bunga cengkeh. Aktivitas antioksidan seduhan daun dan bunga cengkeh dengan masing-masing konsentrasi 10,20,30,40 dan 50 ppm diuji terhadap radikal bebas DPPH (1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl) menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis.

Data hasil penelitian dalam bentuk nilai absorbansi dianalisis untuk menentukan nilai persen inhibisi (% hambat). Dibuat persamaan regresi linier antara konsentrasi dan persen inhibisi untuk menentukan nilai  $IC_{50}$  sampel dengan rumus  $y = bx+a$ . Dibandingkan aktivitas antioksidan seduhan daun dan bunga cengkeh berdasarkan nilai  $IC_{50}$ . Penggolongan aktivitas antioksidan didasarkan pada nilai AAI yang diperoleh dari perhitungan konsentrasi akhir DPPH dibagi nilai  $IC_{50}$  masing-masing sampel.

Pengolahan data dari hasil yang diperoleh dianalisis menggunakan metode statistik parametrik yaitu Uji Independent Sample T Test dengan program SPSS pada tingkat kepercayaan 95% untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara rata-rata nilai IC<sub>50</sub> seduhan daun dan bunga cengkeh.

- Jika p-value > 0,05 maka H<sub>0</sub> diterima yang berarti tidak ada perbedaan yang signifikan.
- Jika p-value < 0,05 maka H<sub>0</sub> ditolak yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan.

Pengolahan data hasil uji organoleptik berupa skor skala hedonik dianalisis menggunakan metode statistika non parametrik yaitu Uji Mann Whitney U test dengan program SPSS untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan rata-rata penilaian tingkat kesukaan antara kedua sampel.

- Jika nilai Asymp.Sig > 0,05 maka H<sub>0</sub> diterima yang berarti tidak ada perbedaan yang signifikan.
- Jika nilai Asymp.Sig < 0,05 maka H<sub>0</sub> ditolak yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan.