

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Studi ini dilaksanakan antara bulan Februari – Agustus 2026 di laboratorium fakultas farmasi universitas PGRI madiun, sedangkan analisis aktivitas antioksidan (DPPH, ABTS, FRAP) dan kandungan fenolik total dilakukan di laboratorium kimia fakultas farmasi universitas PGRI madiun.

B. Desain Penelitian

Studi ini menerapkan desain eksperimental di laboratorium dengan maksud untuk membandingkan hasil pengukuran kemampuan antioksidan dari ekstrak etanol daun sirih merah melalui tiga teknik yaitu DPPH, ABTS, dan FRAP. Selain itu, penelitian ini juga menguji hubungan antara aktivitas antioksidan dengan kandungan total fenolik (TPC). Desain ini memungkinkan peneliti untuk mengevaluasi perbedaan tingkat sensitivitas masing-masing metode serta mengetahui hubungan antara kandungan fenolik dengan aktivitas antioksidan (Lister et al., 2019).

C. Populasi, Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel/Bahan uji

1. Populasi

Populasi dalam studi ini bagian dari daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang terkandung senyawa fenolik dan berpotensi memiliki aktivitas antioksidan.

2. Sampel

Sampel pada studi ini menggunakan daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang diperoleh, kemudian dikeringkan, diserbukkan, dan diekstraksi menggunakan pelarut etanol.

3. Teknik Pengambilan Sampel

Metode pengambilan sampel yang diterapkan adalah *purposive sampling*, yang merupakan pemilihan daun sirih merah dengan bentuk yang spesifik, seperti daun segar, tidak rusak, tidak terserang hama, dan berasal dari tanaman yang sama.

4. Bahan Uji

Bahan uji pada studi ini adalah ekstrak etanol daun sirih merah diperoleh melalui proses maserasi, Reagen DPPH, Reagen ABTS, Reagen FRAP, Standar (asam galat untuk TPC, vitamin C atau kuercetin untuk antioksidan. Ekstrak daun sirih merah diperoleh dari proses maserasi dengan pelarut etanol 96%, dan dianalisis kadar total fenolik (TPC) dengan teknik Folin-Ciocalteu (Maria Pérez *et al.*, 2023). Analisis antioksidan diukur pada tiga metode yaitu DPPH, ABTS, dan FRAP, dan melakukan tiga replikasi untuk memastikan hasil yang akurat dan konsisten. Selanjutnya, data yang diperoleh dianalisis secara kuantitatif. Nilai IC₅₀ dari metode DPPH dan ABTS serta nilai absorbansi FRAP dibandingkan langsung untuk menentukan metode mana yang paling sensitif. Analisis korelasi Pearson diuji untuk mengevaluasi keterkaitan antara total kandungan fenolik dengan aktivitas antioksidan menggunakan ketiga metode (Muflihah *et al.*, 2021).

D. Variabel Penelitian dan Definisi operasional

Penelitian ini memiliki beberapa variabel. Variabel independen (bebas) adalah ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang akan dianalisis aktivitas antioksidannya. Variabel dependen (terikat) meliputi aktivitas antioksidan yang diukur dengan tiga metode, yaitu DPPH, ABTS, dan FRAP, serta kandungan total fenolik (TPC) yang diukur menggunakan reagen Folin-Ciocalteu. Hasil aktivitas antioksidan DPPH dinyatakan dalam nilai IC₅₀, ABTS dalam IC₅₀ dan FRAP dalam nilai absorbansi atau ekuivalen mM Fe²⁺. Kandungan fenolik total dinyatakan dalam mg GAE per gram ekstrak. Selain itu, penelitian ini juga menganalisis hubungan aktivitas antioksidan untuk mengetahui korelasi antara komponen kimia dan aktivitas biologisnya. Untuk menganalisis korelasi tersebut digunakan uji pearson (Muflihah *et al.*, 2021)

E. Teknik Pengumpulan Data

Data dalam penelitian ini dikumpulkan melalui berbagai tahapan di laboratorium secara teratur. Pertama, daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang masih segar dikumpulkan, kemudian dikeringkan terlebih dahulu sebelum dihaluskan menjadi serbuk. Kedua, proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan etanol 95% melalui cara maserasi, dan prosesnya dilakukan dengan cara mengaduk terus-menerus selama beberapa hari agar mendapatkan ekstrak yang berkualitas baik (Prayitno *et al.*, 2016). Ketiga, ekstrak yang telah diperoleh dianalisis untuk mengetahui jumlah total senyawa fenolik (TPC) dengan metode Folin-Ciocalteu (Maria Pérez *et al.*, 2023). Selain itu, aktivitas antioksidannya juga diukur dengan tiga metode yaitu DPPH, ABTS, dan FRAP

sesuai dengan langkah-langkah yang sudah ditentukan (Munteanu, IG & Apetrei, 2021). Keempat, semua pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali dalam satu kali pengulangan (triplo) agar hasil yang diperoleh akurat dan konsisten. Hasil yang didapat selanjutnya dicatat dan dianalisis secara kuantitatif untuk menentukan nilai IC₅₀ dari metode DPPH dan ABTS, nilai absorbansi dari metode FRAP, serta jumlah total senyawa fenolik. Lalu, dilakukan analisis korelasi Pearson untuk melihat hubungan antara jumlah total senyawa fenolik dengan hasil aktivitas antioksidan dari ketiga metode tersebut (Muflihah *et al.*, 2021).

Penelitian ini menggunakan data primer, didapat langsung saat pelaksanaan percobaan. Sumber data primer didapatkan dari ekstrak etanol daun sirih merah diambil dari daun segar yang dikumpulkan di Madiun Jawa Timur. Penelitian ini juga diambil dari data sekunder berupa informasi teoritis dan hasil penelitian sebelumnya, diambil dari berbagai sumber ilmiah seperti jurnal, buku ajar, dan artikel relevan. Data sekunder sebagai landasan teoritis dan pembandingan pada proses analisis dan pembahasan hasil agar bisa mendukung penjelasan hasil laboratorium.

F. Instrumen Penelitian

Penelitian ini menggunakan berbagai alat laboratorium standar untuk mendukung seluruh prosedur pengujian. Alat-alat tersebut antara lain spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur absorbansi pada uji DPPH (517 nm), ABTS (734 nm), FRAP (593 nm), serta kandungan fenolik total (765 nm). Selain itu, digunakan alat pendukung meliputi pipet dan mikropipet untuk mengambil

volume reagen dan sampel, timbangan analitik untuk menimbang sampel dan reagen secara tepat, serta labu Erlenmeyer, gelas ukur, corong, magnetic stirrer, dan tabung reaksi untuk proses ekstraksi, pengadukan, dan penyimpanan ekstrak (Munteanu, IG & Apetrei, 2021).

G. Uraian Prosedur Kerja Penelitian:

1. Pengumpulan Bahan

Mengumpulkan daun sirih merah sebanyak 6 kg untuk perlakuan sortasi basah dan dicuci dalam air yang mengalir guna untuk memisahkan pada kotoran yang menempel pada daun sirih. Kemudian di tiriskan biarkan benar benar kering dan kemudian dipotong kecil guna mempermudah proses pengeringan. Kemudian dikeringkan dengan cara dianginkan

2. Pembuatan Ekstrak

Simplisia yang sudah kering di uji kadar air nya dan di blender untuk menghasilkan serbuk yang halus, kemudian diekstraksi menggunakan etanol 96%, pada metode maserasi dengan takaran 1:10 pada media yang gelap serbuk dituang 900gram direndam pada etanol 96% sebanyak 9.000ml selama 3 hari, dengan sekali di aduk, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Ampas direndam lagi dengan etanol 96%. Filtratnya dikentalkan menggunakan rotary evaporator.

H. Uji skrining fitokimia

1. Senyawa Saponin

Diambil 0,5gram fraksi etanol diletakkan pada tabung pereaksi, lalu dituang 10mL air hangat, campuran tersebut dibiarkan dingin, selanjutnya kocok secara kuat hingga 10 detik dan berbentuk buih atau busa (Hanum & Alfarabi, 2022).

2. Senyawa Alkaloid

Serbuk simplisia ditimbang 0,5gram, kemudian tambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9mL aquadest. Panaskan hingga 2 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh akan dilakukan pengujian:

- a. 3 tetes filtrat ditambah 2 tetes pereaksi Mayer, hasilkan endapan berwarna putih atau kuning.
- b. 3 tetes filtrat ditambah 2 tetes pereaksi Bouchardat, hasilkan endapan berwarna merah bata.
- c. 3 tetes filtrat ditambah 2 tetes pereaksi Dragendorff, hasilkan endapan berwarna merah bata.

Jika ada endapan putih pada sedikit 2 atau 3 dari ketiga pengujian di atas, maka ekstrak berarti positif terdapat alkaloida (Hanum & Alfarabi, 2022).

3. Senyawa Flavonoid

Sebanyak 10gram fraksi etanol ditambah 100 mL air panas. Kemudian dipanaskan sekitar 5menit, lalu saring saat masih panas. Setelah itu, 5mL filtrat dicampur dengan 0,1gram serbuk magnesium, 1mL asam klorida pekat, dan 2mL amil alkohol, lalu kocok dan biarkan memisah. Jika terdapat warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol, maka menunjukkan adanya flavonoida (Hanum & Alfarabi, 2022).

4. Senyawa Tanin

Sebanyak 0,5 g fraksi etanol ditambah 10mL aquadest. Setelah itu, filtrat diencerkan dengan aquadest hingga tidak berwarna. Hasil ini diambil 2mL, lalu ditambah 1-2 tetes larutan besi (III) klorida. Jika terjadi perubahan warna menjadi biru atau hitam, maka berarti adanya senyawa tanin (Hanum & Alfarabi, 2022).

5. Senyawa Fenolik

Dalam 1mL larutan ekstrak konsentrasi 1000 µg/mL diambil diletakkan pada tabung reaksi. Selanjutnya, ditambah 2 tetes larutan FeCl₃ 5%. Adanya senyawa fenolik dalam sampel ditandai munculnya warna hijau atau biru yang pekat (Syaron et al., 2020).

I. Uji Antioksidan dan Analisis Korelasi

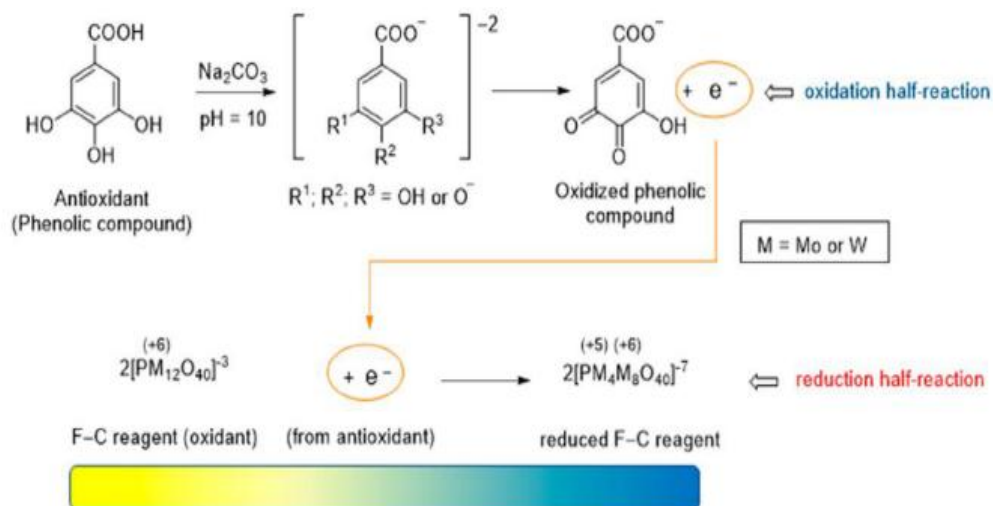
1. Persiapan Larutan dan Sampel

Ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) dilarutkan dalam etanol atau pelarut sesuai dengan metode yang digunakan. Larutan standar seperti gallic acid disiapkan untuk mengkalibrasi kandungan fenolik total (TPC). Sementara itu, larutan DPPH, ABTS, dan FRAP juga disiapkan sesuai dengan konsentrasi kerja yang dianjurkan. Sementara itu, larutan kuersetin disiapkan sebagai control positif pada uji aktivitas antioksidan metode DPPH, ABTS, dan FRAP.

2. Pengukuran kandungan Fenolik Total (TPC)

Ekstrak dicampur dengan reagen Folin-Ciocalteu dan natrium karbonat. Campuran tersebut dibiarkan 30 menit di suhu ruangan. Absorbansi diukur

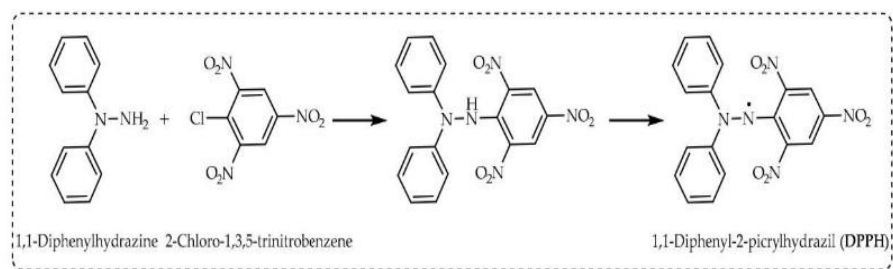
pada panjang gelombang 765nm. Hasil didapat pada satuan mg GAE/g ekstrak (Maria Pérez *et al.*, 2023)



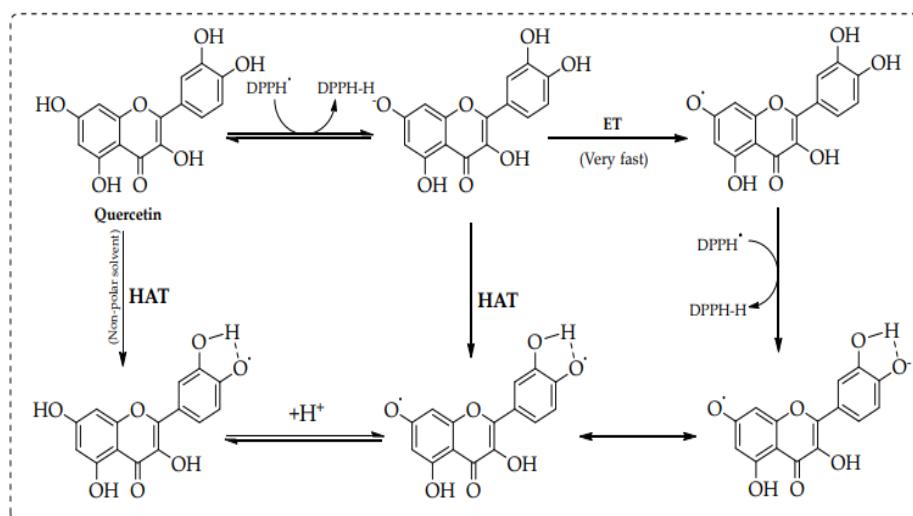
Gambar 3. 1. Reaksi redoks umum dalam uji FolinĀCiocalteu. Spesies kompleks logam menurut (Munteanu, IG & Apetreȳ, 2021).

3. Uji DPPH

Ekstrak dicampur dengan larutan DPPH. Campuran tersebut dibiarkan 30menit dalam ruang gelap. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 517nm. Hasil dinyatakan pada IC50, dengan konsentrasi yang mampu menurunkan 50% aktivitas radikal DPPH (Munteanu, IG & Apetreȳ, 2021). Sebagai pembanding menggunakan kuersetin dengan reaksi yang ditunjukkan pada gambar 3.3. kuersetin sebagai flavonoid antioksidan yang stabil dapat mengubah radikal DPPH berwarna ungu menjadi DPPH-H berwarna kuning (Gulcin & Alwasel, 2023).



Gambar 3. 2. Rute sintesis radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH·)



Gambar 3. 3. Reaksi antara radikal bebas DPPH dan molekul kuersetin.

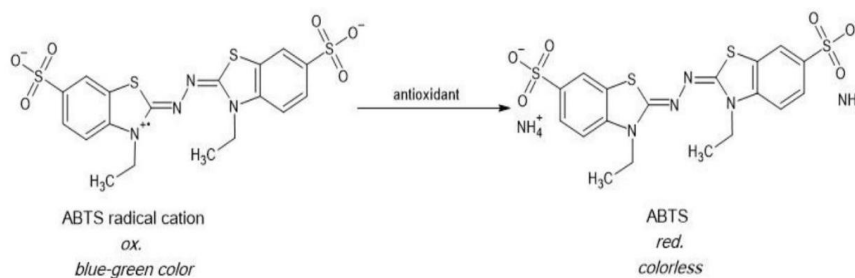
4. Perhitungan IC50

Aktivitas antioksidan bisa dilihat dari nilai IC50. IC50 adalah konsentrasi yang menghambat 50% radikal bebas. Untuk mengetahui nilai IC50 dari ekstrak etanol dan fraksi daun sirih merah, terlebih dahulu data hasil pengukuran absorbansi sampel dikurangi dengan faktor koreksi dari larutan uji. Faktor koreksi ini didapat dari absorbansi larutan ekstrak tanpa ditambahkan DPPH dikurangi dengan absorbansi metanol sebagai blanko. Setelah itu, dilakukan perhitungan % inhibisi menggunakan persamaan berikut : (Sumarni *et al.*, 2019).

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs Sampel Terkoreksi}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100\%$$

5. Uji ABTS

Radikal $\text{ABTS}^{\bullet+}$ dibuat melalui proses oksidasi larutan ABTS. Ekstrak dicampur dengan larutan $\text{ABTS}^{\bullet+}$ lalu dibiarkan selama beberapa waktu. Absorbansi diukur pada 734 nm. Hasil dinyatakan dalam bentuk IC50 atau persentase penangkapan radikal (Pressy *et al.*, 2016). ABTS dalam bentuk radikal kation ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) memiliki warna biru kehijauan sebagai akibat dari proses oksidasi. Ketika senyawa antioksidan ditambahkan, radikal tersebut akan menerima elektron atau atom hidrogen sehingga menjadi bentuk netral tidak berwarna (Kadac-czapska & Grembecka, 2025)

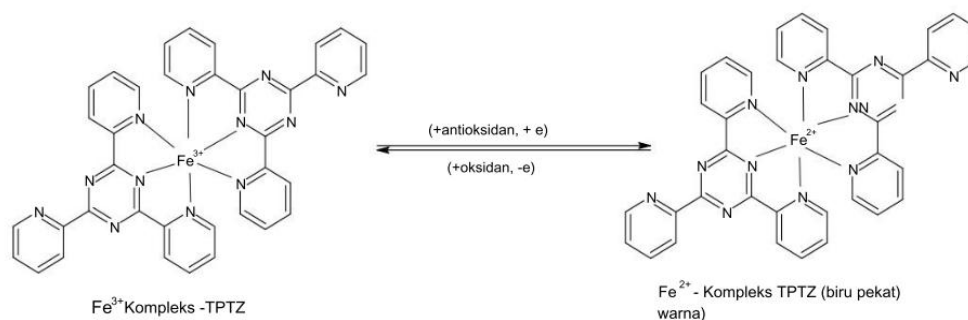


Gambar 3. 4.Skema reaksi yang terjadi antara radikal ABTS dan antioksidan.

6. Uji FRAP

Ekstrak dicampur dengan reagen Fe^{3+} -TPTZ. Sebuah kompleks biru terbentuk, dan absorbansinya diukur pada panjang gelombang 593 nm. Hasil dinyatakan dalam satuan absorbansi atau ekuivalen mM Fe^{2+} (Munteanu, IG & Apetrei, 2021). Pada gambar 3.4 menunjukkan kompleks Fe^{3+} -TPTZ direduksi menjadi Fe^{2+} -TPTZ oleh senyawa antioksidan. Dalam proses ini, antioksidan bertindak sebagai donor elektron (+e), sehingga ion besi (Fe^{3+}) mengalami reduksi menjadi Fe^{2+} . Perubahan ini ditandai dengan terbentuknya kompleks Fe^{2+} -TPTZ yang menghasilkan warna biru pekat. Sebaliknya, jika terjadi

oksidasi, Fe^{2+} dapat kembali menjadi Fe^{3+} dengan melepaskan elektron ($-e$). Intensitas warna biru yang terbentuk sebanding dengan kemampuan reduksi atau aktivitas antioksidan dari sampel yang diuji.



Gambar 3. 5. mekanisme reaksi pada metode FRAP

7. Pengulangan

Semua pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali untuk memastikan hasil yang akurat dan konsisten.

8. Analisis Korelasi

Data aktivitas antioksidan dari uji DPPH, ABTS, dan FRAP kemudian dianalisis bersama kandungan TPC menggunakan uji korelasi Pearson. Nilai r menunjukkan tingkat dan arah hubungan antara kedua variabel: r positif berarti aktivitas antioksidan meningkat seiring dengan peningkatan TPC, r negatif menunjukkan bahwa IC_{50} menurun seiring dengan peningkatan TPC, artinya antioksidan lebih kuat. Nilai $p\text{-value} < 0,05$ menunjukkan hubungan antara kedua variabel secara statistik signifikan (Muflihah *et al.*, 2021).

J. Teknik Analisis Data

Data didapat dianalisis menggunakan metode kuantitatif menggunakan program SPSS. Analisis yang dilakukan meliputi:

1. Uji korelasi Pearson untuk mengetahui hubungan antara kadar total fenolik dengan aktivitas antioksidan yang diukur pada tiga metode yaitu DPPH, ABTS, dan FRAP. Nilai p yang kurang dari 0,05 dianggap memiliki kesesuaian secara statistik (Muflihah *et al.*, 2021).
2. Uji One Way ANOVA digunakan sebagai perbandingan nilai rata-rata aktivitas antioksidan dari ketiga metode tersebut, sehingga dapat dinyatakan metode mana yang paling sensitif dan mewakili hasil yang akurat.