

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan nilai IC_{50} dalam madu amfoang.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium kimia dan instrumentasi Prodi D-III Farmasi Kemenkes Poltekkes Kupang, serta dilakukan pengujian menggunakan spektrofotometri Uv – Vis di laboratorium Prodi D-III Farmasi Kemenkes Poltekkes Kupang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Februari – April 2026.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah madu yang berasal dari Kecamatan amfoang, Kabupaten kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT).

2. Sampel

Sampel penelitian terdiri dari madu yang diperoleh dari wilayah amfoang timur, amfoang tengah, dan amfoang selatan, Kecamatan amfoang, Kabupaten kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah madu yang diambil di wilayah amfoang timur, tengah dan selatan, Kabupaten upang, Nusa Tenggara Timur (NTT).

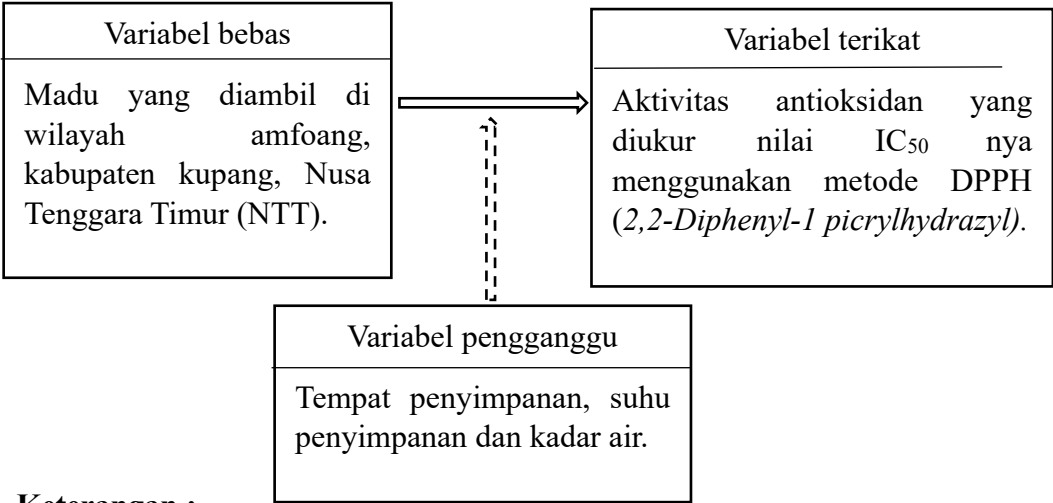
2. Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah aktivitas antioksidan yang diukur nilai IC₅₀nya menggunakan metode DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl).

3. Variabel Penganggu

Variabel penganggu adalah tempat penyimpanan, suhu penyimpanan dan kadar air.

E. Kerangka Konsep



Keterangan :

: Diteliti

: Tidak diteliti

F. Defenisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No.	Variabel	Defenisi Operasional	Skala
1	Konsentrasi madu amfoang	Konsentrasi madu amfoang adalah tingkat pengenceran sampel madu amfoang yang digunakan dalam uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, yang dibuat dalam lima seri konsentrasi yaitu 4.000 ppm, 6.000 ppm, 8.000 ppm, 10.000 ppm, dan 12.000 ppm.	Rasio
2	Aktivitas antioksidan madu Amfoang	Aktivitas antioksidan madu amfoang adalah kemampuan sampel madu dalam meredam radikal bebas DPPH yang ditunjukkan oleh penurunan absorbansi larutan DPPH pada panjang gelombang 515 – 520 nm, yang dinyatakan dalam persen inhibisi (%), persamaan regresi linear dan nilai IC ₅₀ .	Rasio
3	Variabel Penganggu	Variabel pengganggu adalah faktor-faktor yang dapat memengaruhi hasil uji aktivitas antioksidan yaitu tempat penyimpanan, suhu penyimpanan dan kadar air.	Nominal

G. Alat dan Bahan

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometri Uv – Vis (*Shimadsu tipe UV-1700*), neraca analitik, beaker gelas (*pyrex*) berbagai ukuran, gelas ukuran (*pyrex*) berbagai ukuran, labu ukur (*pyrex*) berbagai ukuran, erlenmeyer (*pyrex*), batang pengaduk (*pyrex*), tabung reaksi (*pyrex*), mikropipet (*dragon med*), pipet tetes (*pyrex*), vial (*promedica*), pipet ukur, sendok tanduk (*RRC*), kertas perkamen (*medica*), kertas saring (*whatman*), kain flanel, tissue (*paseo*), aluminium foil (*adimas*).

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa madu dari amfoang timur, tengah, dan selatan, serbuk DPPH (*aldrich*), etanol 95% (*onemed*), aquadest (*alkemi*), dan baku pembanding asam askorbat (*supelco*).

H. Prosedur Penelitian

1. Proses pengambilan madu hutan amfoang

Proses pengambilan madu hutan amfoang diawali dengan penentuan lokasi sarang lebah oleh pemburu madu. Setelah menyiapkan peralatan, pemburu madu memanjat pohon dengan membawa asap untuk menghalau lebah, setelah lebah pergi dari sarangnya, pemburu lebah mengambil sarang madu dengan hati-hati, dan hanya menyisakan bagian yang berisi larva. Sarang yang telah diambil kemudian diturunkan dan madu dikumpulkan. Setelah panen, lokasi sarang dijaga kelestariannya.

2. Uji aktivitas antioksidan

a. Pembuatan larutan stok DPPH 0,5 mM

Ditimbang serbuk DPPH sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 95% sampai tanda batas pada labu ukur 50 mL, digojok hingga homogen sehingga diperoleh konsentrasi 200 ppm, yang dihitung terhadap BM DPPH sebesar 394,32 g/mol. Labu ukur yang digunakan dilapisi aluminium foil dan disimpan terhindar dari cahaya matahari.

b. Pengukuran absorbansi blanko

Dimasukan 1 mL DPPH ditambahkan 4 mL etanol 95% kedalam vial yang ditutup aluminium foil, larutan tersebut kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit. Blanko pada penelitian ini menggunakan etanol 95%. Larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 515 – 520 nm.

c. Absorbansi perendaman radikal DPPH

Diambil sebanyak 4 mL blanko larutan uji dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH dimasukkan dalam vial lalu dikocok. Larutan didiamkan selama 30 menit, kemudian di baca serapannya pada panjang gelombang maksimum (Andini *et al.*, 2017).

d. Pengukuran absorbansi larutan pembanding

Ditimbang asam askorbat (vitamin c) sebanyak 5 mg, dilarutkan dengan etanol 95% dimasukan kedalam labu ukur dan ditambahkan pelarut hingga 50 mL, kemudian digojok hingga homogen dan diperoleh konsentrasi larutan 100 ppm. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm dan ditambahkan etanol 95% hingga tanda batas. Untuk pengukuran absorbansi, masing – masing seri konsentrasi dipipet sebanyak 4 mL dimasukan ke dalam vial yang ditutup aluminium foil, kemudian ditambahkan 1 mL DPPH, selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit. Larutan dibaca absorbansinya pada Panjang gelombang maksimum. Pengerjaan di replikasi sebanyak 3 kali.

e. Pengukuran absorbansi sampel madu

Ditimbang madu sebanyak 2.500 mg, dilarutkan dalam etanol 95% dimasukan kedalam labu ukur dan ditambahkan pelarut hingga 50 mL, kemudian dikocok hingga homogen. Selanjutnya, dibuatkan seri konsentrasi 4.000, 6.000, 8.000, 10.000, dan 12.000 ppm dan ditambahkan etanol 95% hingga tanda batas. Untuk pengukuran absorbansi masing – masing seri konsentrasi dipipet 4 mL dimasukan ke dalam vial yang ditutup aluminium foil, kemudian ditambahkan 1 mL DPPH, Selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit. Larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Pengerjaan direplikasi sebanyak 3 kali.

I. Analisis Data

Hasil pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk menghitung persentase perendaman radikal bebas DPPH. Nilai IC_{50} dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing – masing konsentrasi larutan uji serta larutan sampel. Persentase inhibisi dapat dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{In. DPPH (\%)} = \frac{(A \text{ blanko} - A \text{ sampel})}{A \text{ blanko}} \times 100$$

Keterangan :

A blanko = Serapan radikal DPPH

A sampel = Serapan sampel terhadap radikal DPPH

Daya antioksidan perendaman radikal bebas DPPH, dianalisis dengan masing – masing dihitung nilai IC_{50} nya menggunakan analisis regresi linear.

Berikut persamaan regresi linear :

$$y = ax + b$$

Keterangan :

y = Persentase aktivitas antioksidan

a = Konsentrasi larutan uji

b = Tanpa intersep (perpotongan garis di sumbu y)

Hasil analisis regresi linear ditentukan ditentukan nilai IC_{50} nya dengan tabel 1 yaitu tingkat kekuatan antioksidan.