

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan pendekatan kuantitatif. Pendekatan ini dipilih untuk memperoleh nilai IC_{50} guna menentukan secara akurat kekuatan aktivitas antioksidan selai coklat tersebut.

B. Objek Penelitian

Objek yang digunakan dalam penelitian ini yaitu selai coklat daun kelor.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Produksi dan Teknologi Bentuk Sediaan Farmasi, bagian dari Program Studi Diploma III Farmasi di Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan, Kupang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan berlangsung dari Februari hingga Juni 2026.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi selai coklat daun kelor (*Moringa oleifera*) adalah 6000 ppm, 7000 ppm, 8000 ppm, 9000 ppm dan 10.000 ppm.

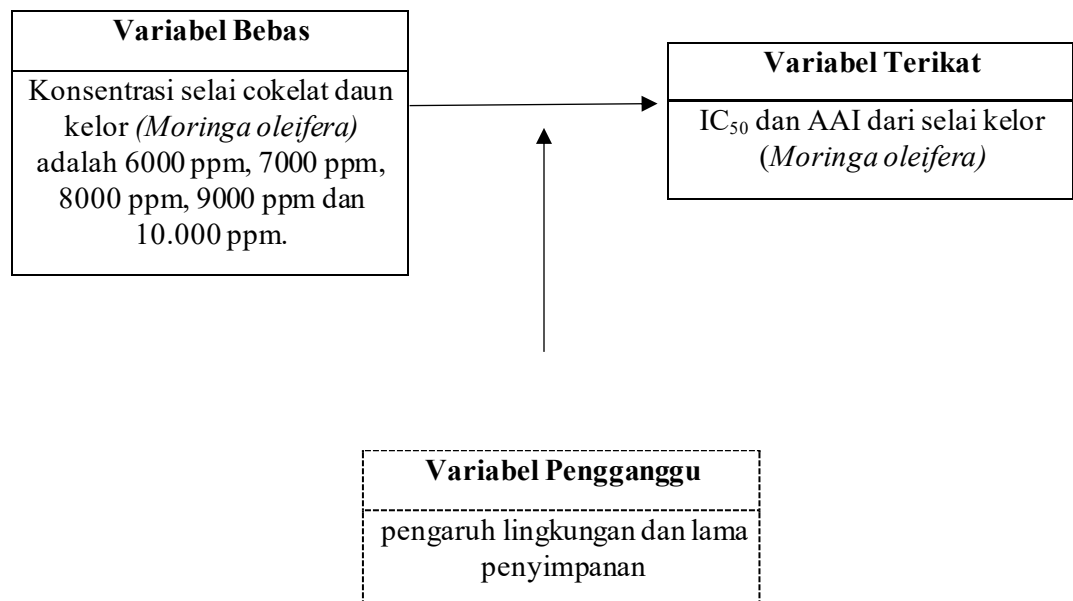
2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah IC_{50} dan AAI dari selai coklat kelor (*Moringa oleifera*).

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu pada penelitian ini adalah adanya pengaruh lingkungan dan lama penyimpanan.

E. Kerangka Konsep



Gambar 3.

antar variabel

Hubungan

Keterangan:

———— : yang diteliti
 ----- : tidak diteliti

F. Definisi Operasional

Tabel 5. Definisi operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala
1.	Bubuk daun kelor	Bubuk daun kelor dengan nama produk <i>Moringa oleifera</i> KOE yang diperoleh dari wilayah Jl. Bumi, Kec. Oebobo, Kota Kupang, Nusa Tenggara Timur.	-	Rasio
2.	Selai coklat daun kelor	Produk olesan yang dicampur dengan bubuk daun kelor, bubuk coklat, gula halus, susu bubuk, kacang mete, VCO, GMS (<i>Glyceryl Monostearate</i>)	Timbangan Analitik	Rasio
3.	Aktivitas antioksidan	Kemampuan senyawa dalam selai coklat daun moringa untuk menangkal radikal bebas DPPH, yang diukur sebagai Konsentrasi Penghambatan 50% (IC_{50}), menunjukkan aktivitas antioksidannya.	Spektrofotometri UV-VIS	Rasio
4.	AAI (<i>Antioxidant Activity Indeks</i>)	Rasio antara konsentrasi DPPH akhir dan nilai IC_{50} dari selai coklat daun moringa memperkuat penentuan standar potensi antioksidan.	Spektrofotometri UV-VIS	Rasio
5.	IC_{50} (<i>Inhibitory Concentration 50</i>)	Konsentrasi selai coklat daun kelor yang dibutuhkan untuk menghambat atau menekan 50% aktivitas radikal bebas DPPH.	Spektrofotometri UV-VIS	Rasio

G. Formula

Tabel 6. Formula selai coklat daun kelor

No	Nama Bahan	Konsentrasi %		
		F1	F2	F3
1.	Bubuk daun kelor	0%	2,5%	12,5%
2.	Bubuk kakao	20%	17,5%	7,5%
3.	Gula halus	20%	20%	20%
4.	Susu bubuk	14%	14%	14%
5.	Kacang mete	30%	30%	30%
6.	VCO	15%	15%	15%
7.	GMS (<i>Glyceryl Monostearate</i>)	1%	1%	1%

Sumber: modifikasi dari (Navnath dan B 2025)

H. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah spektrofotometer *UV-VIS* (*shimadzu type UV-1700*), timbangan analitik (*type EW-220-3NM*). Peralatan pendukung laboratorium terdiri dari *vortex*, *centrifuge*, pipet volume, mikropipet, labu ukur 100 mL, 50 mL, 25 mL, 10 mL, *beaker glass* (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), vial, corong (*herma*). Proses pembuatan sediaan selai menggunakan kompor gas portable (*niko*), wajan anti lengket (*takaful*), wadah aluminium, termometer masak digital (*joil*), blender (*philips*), ayakan tepung, spatula plastik (*kinco*), piring kecil, sendok (*doll*), wadah selai, toples, serta bahan habis pakai berupa kertas saring (*whatman No. 42*), kertas perkamen, kertas label, aluminium foil.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan untuk pembuatan selai yang meliputi bubuk daun kelor (*Moringa oleifera* KOE), bubuk kakao (*van houten*), gula halus (*rose brand*), susu bubuk (*dancow*), kacang mete, *Virgin*

Coconut Oil (VCO), *Glyceryl Monostearate* (GMS). Bahan untuk uji aktivitas antioksidan meliputi etanol 95%, *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil* (DPPH), dan vitamin C sebagai kontrol positif.

I. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Selai Cokelat Daun Kelor

Proses pembuatan selai diawali dengan menyangrai kacang mete hingga matang hingga berwarna kuning kecokelatan, kemudian dihaluskan menggunakan blender dan disaring dengan ayakan untuk memperoleh tekstur yang lebih halus. Selanjutnya dicampurkan bersama bubuk cokelat, gula halus, susu bubuk dan GMS yang sudah di ayak agar teksturnya lebih halus dan dapat homogen. Selanjutnya, dimasukkan di dalam wajan anti-lengket di atas kompor dengan api kecil. Suhu proses ini dipantau secara ketat menggunakan termometer digital agar tidak melebihi 60°C. lalu tambahkan VCO sebagai fase minyak jangan di atas kompor guna mencegah oksidasi lemak yang dapat memicu bau tengik secara bertahap sambil diaduk konstan menggunakan spatula hingga seluruh bubuk terbasahi dan membentuk selai yang halus. Setelah suhu adonan menurun, bubuk daun kelor dimasukkan secara langsung ke dalam adonan untuk menjaga agar zat aktif antioksidannya tidak rusak. Tahap akhir dilakukan dengan mengaduk kembali seluruh bahan hingga benar-benar tercampur homogen (Navnath dan B 2025).

2. Prosedur Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM

Larutan DPPH dibuat dengan menimbang 0,01577 g serbuk DPPH dan memasukkannya ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian dilarutkan dengan etanol 95% hingga tanda batas 100 mL untuk memperoleh larutan stok DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM. Larutan ini harus disimpan di tempat gelap atau dibungkus dengan aluminium foil.

b. Penentuan panjang gelombang maksimum ($\lambda_{\max}$)

Sebanyak 4 mL etanol ditambahkan ke dalam 1 mL larutan DPPH 0,4 mM, campuran tersebut dikocok hingga homogen, dan absorbansinya diukur pada rentang panjang gelombang 400–800 nm dengan menggunakan etanol sebagai blanko.

c. Pembuatan larutan uji

Larutan uji dibuat dengan cara menimbang selai cokelat daun kelor (*Moringa oleifera*). Gunakan rasio 1 g : 10 mL antara sampel dan pelarut (etanol 95%). Campuran divorteks selama 15–30 menit agar semua senyawa aktif keluar. Pindahkan larutan ke tabung sentrifugasi. Putar dengan kecepatan tinggi 4000 rpm selama 5–10 menit. Ambil cairan jernihnya saja (*supernatan*), masukkan kembali ke labu ukur, lalu cukupkan volumenya hingga tepat 50 mL dengan etanol 95%, hingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 20.000 ppm. Selanjutnya, dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 6.000 ppm, 7.000 ppm, 8.000 ppm, 9.000 ppm dan 10.000 ppm dengan cara memipet volume

tertentu dari larutan induk dan menambahkan etanol 95% untuk memperoleh konsentrasi yang diinginkan.

d. Optimasi waktu inkubasi

Sebanyak 1 mL larutan reagen DPPH ditambahkan ke dalam 4 mL larutan uji (dengan berbagai konsentrasi) di dalam vial, campuran tersebut dikocok, didiamkan, dan ditutup rapat dengan aluminium foil. Absorbansi diukur pada panjang gelombang absorbansi maksimum pada menit ke-0, 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 (dengan interval 10 menit) untuk menentukan waktu yang paling tepat. Waktu optimal yang didefinisikan sebagai durasi inkubasi yang menghasilkan nilai absorbansi yang cukup stabil diketahui adalah 30 menit.

e. Pembuatan larutan pembanding Vitamin C

Sebanyak 5 mg vitamin C ditimbang dan dilarutkan dalam 50 mL etanol untuk menghasilkan lingkungan stok vitamin C dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan kemudian berevolusi hingga mencapai konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm.

f. Pengukuran aktivitas antioksidan larutan uji selai cokelat daun kelor (*Moringa oleifera*) dan larutan pembanding Vitamin C

Sebanyak 4 mL dari setiap larutan uji dan larutan pembanding dimasukkan ke dalam vial. Kemudian, 1 mL larutan DPPH ditambahkan ke setiap vial, dan campuran dihomogenkan. Sampel kemudian diinkubasi di tempat yang terlindung dari cahaya selama 30 menit, durasi yang ditetapkan berdasarkan hasil optimasi waktu inkubasi. Terakhir, absorbansi diukur menggunakan

spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang absorbansi maksimum yang telah ditentukan selama proses optimasi panjang gelombang (Potalangi *et al.* 2024).

J. Analisis Data

1. Penentuan % inhibisi

Persentase inhibisi radikal DPPH untuk setiap konsentrasi dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

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

Keterangan:

Absorbansi kontrol: absoransi radikal DPPH (blanko) dalam etanol 95% pada panjang gelombang serapan maksimum yang telah ditentukan.

Absorbansi sampel: Serapan sampel terhadap radikal DPPH diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya (Dewi *et al.* 2025).

2. Nilai *Inhibition Concentration* (IC₅₀)

Nilai persentase inhibisi yang diperoleh sebelumnya diplotkan pada sumbu y, sedangkan konsentrasi sampel diplotkan pada sumbu x untuk mendapatkan persamaan regresi linier. Persamaan regresi linier yang dihasilkan berbentuk $y = a + bx$ (Dewi *et al.* 2025).

Keterangan:

y = persentase peredaman

x = konsentrasi

a = intersep

b = koefisien regresi/ slope

3. Penentuan nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*)

Nilai AAI dapat ditentukan dengan membagi konsentrasi DPPH yang digunakan dalam pengujian (ppm) dengan nilai IC₅₀ yang diperoleh (ppm) (Dewi *et al.* 2025).

Perhitungan nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*) digunakan untuk mengetahui indeks aktivitas antioksidan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Nilai AAI} = \frac{\text{Konsentrasi DPPH (ppm)}}{\text{IC}_{50} \text{ Sampel (ppm)}}$$