

BAB IV

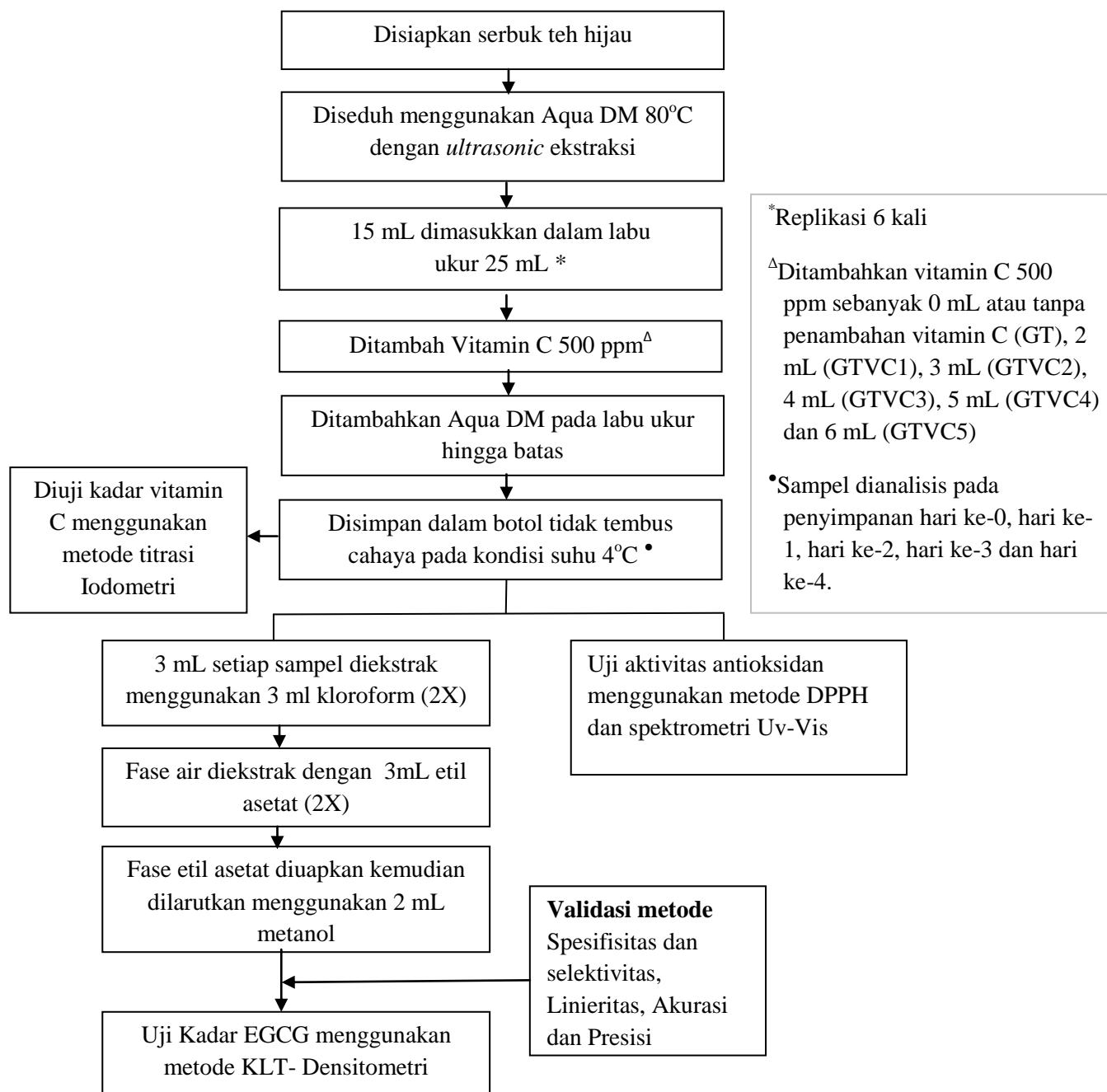
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan model rancangan penelitian eksperimental. Model rancangan eksperimental ini digunakan untuk menunjukkan apakah terdapat hubungan sebab akibat antara perlakuan dan respon yang dihasilkan. Penelitian ini dibagi menjadi 4 tahap. Tahap pertama yaitu validasi metode, tahap kedua yaitu pengujian kadar EGCG dan daya aktivitas antioksidan awal pada seduhan teh hijau, tahap ketiga yaitu penambahan vitamin C dengan kadar tertentu dan disimpan sesuai dengan lamanya waktu penyimpanan yang telah dipilih. Tahap keempat yaitu pengujian kadar EGCG dan daya aktivitas antioksidan pada campuran seduhan teh hijau dan vitamin C setelah waktu penyimpanan tertentu.

Pengujian kadar EGCG dan aktivitas antioksidan (IC_{50}) dilakukan pada 6 kelompok sampel yaitu seduhan Teh Hijau (TH), Teh Hijau + Vitamin C 1 mg (THVC1), Teh Hijau + Vitamin C 1,5 mg (THVC2), Teh Hijau + Vitamin C 2 mg (THVC3), Teh Hijau + Vitamin C 2,5 mg (THVC4) dan Teh Hijau + Vitamin C 3 mg (THVC5). Setiap kelompok sampel diuji kadar EGCG dan daya aktivitas antioksidan setelah waktu penyimpanan selama 0 hari, 1 hari, 2 hari, 3 hari dan 4 hari. Setiap waktu penyimpanan dilakukan pengujian kadar EGCG dan daya aktivitas antioksidan sebanyak tiga kali replikasi. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui stabilitas EGCG dan stabilitas aktivitas antioksidan pada seduhan teh hijau. Kondisi penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C dengan tempat penyimpanan berupa botol gelap dan tertutup rapat.

Secara skematis, tahapan penelitian digambarkan dalam kerangka operasional pada Gambar 4.1



Gambar 4. 1 Bagan Kerangka Operasional Penelitian

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu bubuk teh hijau dengan merk lokal dari kota Surabaya-Indonesia.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Kadar Vitamin C yang ditambahkan dan waktu penyimpanan

Variabel tergantung : Kadar EGCG dan aktivitas antioksidan

Variabel penghubung : Penghambatan pembentukan EGCG radikal oleh vitamin C

Variabel Kendali : Suhu, metode penyeduhan teh hijau dan kondisi penyimpanan

4.4 Bahan penelitian

Bahan- bahan yang digunakan yaitu standards EGCG (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Chloroform *pro analysis* (Merck), Ethyl Acetate *pro analysis* (Fulltime), asam format *pro analysis* (Merck), aceton *pro analysis* (Smart-Lab). Vitamin C dari Sigma Chemical, metanol *pro analysis* (Fulltime) dan fase diam TLC silika gel plate aluminum 60F-254 (Merck made in Germany). Potasium Iodate (Merck), starch (Merck), potassium iodide dan HCl, DPPH (Sigma Aldrich)

4.5 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini berupa tabung reaksi, pipet volume 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5mL dan 6 mL, pipet tetes, gelas ukur 5 mL, labu ukur 5 mL, 10 mL, 25 mL dan 100 mL, timbangan analitik, timbangan analitik mikro, oven, *Shaking water bath* urltrasonik, chamber, *Membran nylon syringe filter*, KLT-Densitometer (Camag), Linomat (Camag) dan Spektrofotometri UV-Vis

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium departemen kimia farmasi Universitas Airlangga Surabaya dengan waktu yang dibutuhkan untuk penelitian yaitu 3 bulan. Dari bulan Februari hingga bulan Oktober.

4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

4.7.1 Pembuatan larutan standar vitamin C

Dibuat larutan vitamin C dengan menimbang Vitamin C baku standar 12,5 mg menggunakan timbangan analitik mikro, kemudian larutkan dalam 25 ml aquades dalam labu ukur sehingga membentuk konsentrasi 500 ppm.

4.7.2 Preparasi Sampel Seduhan Teh Hijau

Ditimbang serbuk teh hijau sebanyak 0,25 mg, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 25 ml, lalu ditambah aquades secukupnya dengan suhu 80°C. Selanjutnya di *shaker* pada *shaking water bath ultrasonic* dengan suhu 80°C. Kemudian sampel ditambah vitamin C 1 mg (THVC1), 1,5 mg (THVC2), 2 mg (THVC3), 2,5 mg (THVC4) dan 3 mg (THVC5). Selanjutnya ditambah aquades hingga tanda batas. Disiapkan juga seduhan teh hijau tanpa penambahan vitamin C (TH). Selanjutnya, sampel disimpan pada botol gelap dengan suhu penyimpanan 4°C.

4.7.3 Optimasi Fase Gerak

Jenis fase gerak yang dioptimasi dalam penelitian ini dipilih dari fase gerak kloroform : aseton : asam format dengan perbandingan yang berbeda-beda. Kloroform : aseton : asam format (10:8:3), kloroform : aseton : asam format (10:8:2) dan kloroform : aseton : asam format (10:8:1). Setelah dicampur sesuai perbandingan, fase gerak diultrasonik Selama 5 menit agar tercampur sempurna. Kemudian fase gerak dituang

dalam chamber dan dijenuhkan selama 2 jam. Dipilih fase gerak yang diperoleh pemisahan lebih baik.

4.7.4 Pembuatan larutan standar EGCG

Dibuat larutan EGCG dengan menimbang EGCG baku standart 5 mg menggunakan timbangan mikro, kemudian larutkan dalam 10 ml metanolp.a dalam labu ukur sehingga membentuk konsentrasi 500 ppm. Kemudian larutan standar EGCG 500 ppm diencerkan menjadi 450 ppm, 400 ppm, 350 ppm, 300 ppm, 250 ppm, 200 ppm, 150 ppm, 100 ppm dan 50 ppm.

4.7.5 Ekstraksi Seduhan Teh Hijau

3 ml larutan sampel dimasukkan dalam corong pisah, kemudian ditambahkan klorofom 3 ml. Selanjutnya diekstrak selama 1 menit dengan kecepatan konstan. Ekstraksi menggunakan klorofom dilakukan sebanyak 2x. Setelah diekstrasi fase klorofom dibuang sedangkan fase air ditambah dengan *etil asetat* 5 ml kemudian diekstraksi sebanyak dua kali. Pada hasil ekstraksi etil atetat, fase air dibuang sedangkan fase *etil asetat* diuapkan hingga kering dilemari asam.

4.7.6 Optimasi Panjang Gelombang EGCG

Dibuat larutan standar EGCG dengan konsentrasi 100 ppm & 200 ppm, kemudian diuji menggunakan spektrometer UV-Vis pada λ 200-400 nm dengan blanko metanol. Panjang gelombang dengan serapan paling besar merupakan panjang gelombang pengamatan yang akan digunakan pada densitometri.

4.7.7 Optimasi Teknik Penotolan

Dibuat larutan standar EGCG dengan konsentrasi 200 ppm. Kemudian ditotolkan sebanyak 3 kali menggunakan teknik linomat dan teknik manual pada *plate* KLT. Kemudian dielusi dengan fase gerak terpilih. Setelah dielusi, selanjutnya dilakukan uji kuantitatif

menggunakan densitometer pada panjang gelombang terpilih.. Luas area yang terbaca dihitung *recovery* dan RSD pada setiap teknik penotolan.

4.7.8 Validasi Metode

4.7.8.1 Selektivitas/Spesifisitas

Dibuat larutan baku EGCG dengan kadar 500 ppm dan larutan ekstrak sampel seduhan teh hijau. Kemudian larutan dihomogenkan menggunakan ultrasonik dan disaring dengan membran filter 0,2 μm , kemudian ditotolkan pada *plate* KLT menggunakan linomat. Selanjutnya, *discan* pada panjang gelombang terpilih menggunakan Densitometer. Kemudian dihitung dan dibandingkan nilai R_s (resolusi), R_f dan nilai *purity* dari *peak* standar EGCG dan sampel ekstrak seduhan teh hijau.

4.7.9.2 Linieritas

Ditimbang standar EGCG sebanyak 5 mg kemudian dilarutkan dengan methanol pada dalam labu ukur 10 mL sehingga membentuk larutan satandar EGCG 500 ppm. Dari larutan stok EGCG 500 ppm diencerkan membentuk konsentrasi 450 ppm hingga 50 ppm. Kemudian masing-masing larutan standar disaring dengan membrane filter 0,2 μm . Selanjutnya dianalisis menggunakan metode KLT-Densitometri. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplotkan luas area *peak* vs massa EGCG. Persamaan kurva linier akan diperoleh dalam bentuk $y = bx + a$. Linieritas dapat diperoleh dengan menghitung koefisien determinasi (r) kemudian dibandingkan dengan r tabel. Data dikatakan linier jika r hitung lebih besar dari pada r tabel. V_{xo} juga perlu dihitung untuk mengetahui penyebaran data keberulangan.

4.7.9.3 Akurasi

Ditambahkan standar EGCG pada larutan sampel ekstrak hingga memperoleh konsentrasi 80%, 100% dan 120% dari kadar EGCG dalam sampel. Kemudian disaring

dengan membrane filter 0,2 μ m. Selanjutnya ditotolkan pada *plate* KLT. Selanjutnya,dianalisis kuantitasnya pada kondisi terpilih dengan densitometer. Hasil yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan kadar standar yang ditambahkan. Hitung % recovery yang diperoleh.Setiap konsentrasi diuji dengan tiga kali replikasi. Data dikatakan akurat jika % recovery yang diperoleh antara 80 %-102%

4.7.9.4 Presisi

Dibuat 1 jenis konsentrasi 100% larutan standar EGCG. Selanjutnya larutan standar EGCG tersebut ditambahkan dalam sampel ekstrak. Kemudian disaring dengan membrane filter 0,2 μ m. Selanjutnya ditotolkan pada *plate* KLT dan dianalisis menggunakan densitometer. Pengujian dilakukan sebanyak enam kali replikasi. Presisi diperoleh dengan cara menghitung RSD (%)

4.7.10 Uji Kadar EGCG dengan metode KLT-Densitometri

Ekstrak sampel kering ditambah dengan metanol p.a 2 mL kemudian disaring menggunakan *membrane filter* 0,2 μ m. Selanjutnya sampel ditotolkan menggunakan Linomat pada plat KLT yang telah diaktifkan pada suhu 105°C selama 15 menit. Larutan standar EGCG 500 ppm hingga 50 ppm juga ditotolkan pada plat KLT yang sama dengan sampel. Setelah dilakukan penotolan, plat KLT dielusi menggunakan fase gerak terpilih. Pengujian kadar dilakukan pada waktu penyimpanan 0 hari, 1 hari, 2 hari, 3 hari dan 4 hari. Setelah dielusi, selanjutnya dilakukan uji kuantitatif menggunakan densitometer pada panjang gelombang terpilih. Massa EGCG pada sampel diperoleh dengan cara memasukkan area sampel yang terbentuk pada persamaan kurva linier standar.

4.7.11 Uji Aktivitas Antioksidan dengan metode DPPH

4.7.11.1 Pembuatan larutan DPPH dan penentuan panjang gelombang maksimum

DPPH

3 mg DPPH dilarutkan dalam 100 ml metanol p.a dalam labu ukur 100 ml yang telah ditutup dengan aluminium foil hingga membentuk larutan DPPH 30 ppm. Selanjutnya dibuat larutan DPPH 10 ppm dan 5 ppm, kemudian diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-700 nm dan ditentukan panjang gelombang maksimum. Larutan DPPH 30 ppm yang akan ditambahkan pada sampel diuji absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Larutan DPPH disimpan dalam ruang gelap dan suhu 4°C sebelum digunakan untuk analisis (Shimamura *et al.*, 2014)

4.7.11.2 Penentuan Waktu Yang Dibutuhkan DPPH Untuk Bereaksi Sempurna Dengan Sampel

50 µl sampel seduhan teh hijau tanpa penambahan vitamin C dengan konsentrasi 5000 ppm dicampur dengan 1,95 ml larutan DPPH 30 ppm. Kemudian diukur absorbansinya setiap 5 menit hingga memperoleh nilai absorbansi yang stabil.

4.7.11.3 Pengujian aktivitas antioksidan pada sampel

50 µl setiap konsentrasi pada setiap sample dicampur dengan 1,95 ml Larutan DPPH 35 ppm secara cepat pada tabung reaksi yang telah ditutup aluminium foil. Lalu diaduk dan didiamkan selama waktu yang dibutuhkan DPPH untuk bereaksi sempurna sesuai dengan pengukuran sebelumnya dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH. Pengukuran ini dilakukan setelah penyimpanan 0 jam, 1 jam, 2 jam, 4 jam, 6 jam, 24 jam, 36 jam, 72 jam dan 96 jam (Shimamura *et al.*, 2014). Selanjutnya dihitung % peredaman dengan persamaan 1.

4.7.12 Penentuan Kadar Vitamin C dalam Sampel

4.7.12.1 Pembuatan larutan kalium iodat $0,002 \text{ mol L}^{-1}$

Ditimbang 1 gram kalium iodat (KIO_3), kemudian keringkan semalam pada oven dengan suhu 100°C . Setelah dikeringkan, 0,43 g KIO_3 dilarutkan dalam 1 L aqua DM dalam labu ukur.

4.7.12.2 Pembuatan Larutan Indikator Pati 0,5%

Ditimbang 0,25 gram pati. Kemudian dilarutkan dengan 50 mL aqua DM yang telah dipanaskan pada suhu 80°C selama 1 menit dalam erlemeyer 100 mL. Kemudian diaduk dan didinginkan hingga suhu kamar.

4.7.12.3 Pembuatan larutan kalium iodida $0,6 \text{ mol L}^{-1}$

Ditimbang kalium iodide (KI) sebanyak 10 g, kemudian dilarutkan dengan 50 mL aqua DM dalam labu ukur 100 mL, dikocok dan ditambahkan aqua DM sampai tanda batas.

4.7.12.4 Pembuatan larutan asam klorida (HCl) 1 mol L^{-1}

Dilarutkan 8,3 mL HCl pa (37%) dengan aqua DM dalam labu ukur 100 mL.

4.7.12.5 Uji kadar vitamin C dengan metode Titrasi

Disiapkan ekstrak buah 20 mL dalam Erlenmeyer 250 mL, kemudian ditambah dengan 150 mL aqua DM, 1 mL KI $0,6 \text{ mol L}^{-1}$, 5 mL HCl 1 mol L^{-1} dan 1 mL Indikator Pati. Selanjutnya dititrasi dengan $0,002 \text{ mol L}^{-1}$ larutan KIO_3 hingga mencapai titik akhir dengan terbentuknya perubahan warna menjadi biru-hitam yang stabil selama 1 menit. Dicatat volume larutan KIO_3 yang dibutuhkan untuk mencapai titik akhir. Dihitung kadar vitamin C yang terdapat dalam sampel dengan rumus yang telah dijelaskan diatas. Titrasi dilakukan triplet (3X).

4.8 Cara Pengolahan dan Analisis Data

Hasil data yang diperoleh pada penelitian ini yaitu kadar EGCG dan aktivitas antioksidan (IC_{50}) pada waktu penyimpanan 0 hari, 1 hari, 2 hari, 3 hari, dan 4 hari. Ada 2 jenis statistika yang digunakan pada penelitian ini. Anova *one way* digunakan untuk mengetahui ada atau tidak adanya perbedaan antara sampel tanpa penambahan vitamin C dengan penambahan vitamin C selama waktu penyimpanan. *Repeateded measure* Anova digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan antar waktu penyimpanan pada 1 jenis sampel. Uji homogenitas dan normalitas diukur pada setiap kelompok data.