

**LEMBAR PENGESAHAN
LAPORAN HASIL PENELITIAN**

Judul : Aktivitas Antioksidan Sayur Kale (*Brassica oleracea* Var. *acephala*) pada Berbagai Penyajian dengan Menggunakan Metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

Nama : Indah Juni Florida Daeli

NPM : 20000067

Dosen Pembimbing I



(dr. Henny Erina Saurnauli Ompusunggu, M.Biomed)

Dosen Pembimbing II



(dr. Susi Sembiring, Sp.An)

Dosen Penguji



(dr. Runggu Retno J. Napitupulu, M. Kes)

Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran



(dr. Ade Prya Simaremare, M.Biomed)

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas HKBP Nommensen



(Dr. dr. Icu I. Simanjuntak, Sp. OG)

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Radikal bebas merupakan salah satu faktor yang dapat mengancam sistem imun tubuh manusia baik dari dalam maupun dari luar tubuh sendiri. Radikal bebas adalah molekul yang salah satu ataupun lebih elektron pada orbit terluarnya yang tidak berpasangan, sehingga efek yang disebabkan sangat reaktif. Radikal bebas dapat terbentuk secara internal dan eksternal, secara internal dihasilkan dari sisa metabolisme tubuh, proses oksidasi dan *respiratory burst* sedangkan secara eksternal disebabkan oleh polutan lingkungan, radiasi, inflamasi, dan kekurangan nutrisi.^{1,2} Dalam jumlah normal radikal bebas memiliki berbagai manfaat bagi kesehatan tubuh contohnya membunuh bakteri, memerangi peradangan dan mengendalikan otot polos, namun jika jumlahnya berlebih akan mengakibatkan dampak negatif bagi tubuh sendiri. Dampak dari radikal bebas akan menyebabkan penyakit yang bersifat kronis seperti penyakit jantung, kanker, katarak, dan penyakit infeksi seperti Tuberkulosis dan HIV yang dapat memicu terbentuknya inflamasi dari proses oksidasi sehingga menghasilkan radikal bebas didalam tubuh.^{3,4}

Proses terbentuknya radikal bebas didalam tubuh diawali dengan proses oksidasi yang melibatkan ROS, proses ini terjadi ketika molekul elektron tidak berpasangan mengambil elektron lain yang berada di sekitarnya sehingga terbentuk molekul baru yang dinamakan radikal bebas baru. Jika proses ini berjalan terus-menerus akan membuat terjadinya ketidakseimbangan antara antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh dengan radikal bebas dari proses oksidasi sehingga mengakibatkan terjadi stress oksidatif, keadaan ini dapat diredamkan dengan pemberian senyawa yaitu antioksidan.^{4,5}

Antioksidan mempunyai peran penting untuk menangkal ataupun meredakan efek negatif yang dihasilkan oleh radikal bebas. Ketika terjadi

stress oksidatif, secara alami tubuh dapat menghasilkan antioksidan seperti

superoksida dismutase, katalase dan glutathione peroksidase, tetapi jika stress oksidatif menyebabkan produksi ROS yang berlebihan maka tubuh perlu membutuhkan antioksidan tambahan dari luar yang dapat berasal dari makanan seperti buah dan sayur-sayuran.^{4,5,6}

Sayuran yang memiliki antioksidan yang tinggi adalah sayuran dari famili kubis (*Brassicaceae family*) salah satunya yaitu sayur kale (*Brassica oleracea var. acephala*) merupakan sayur yang sering dikenal dengan kangkung keriting dan berwarna hijau tua. Di luar negeri sayur ini dijuluki sebagai Queen Of Vegetable (Si Ratu Sayuran) karena memiliki banyak manfaat dan mengandung nutrisi yang tinggi. Seiring perkembangan zaman sayur kale cara penanaman sayur kale ada berbagai macam yaitu ada yang menggunakan pupuk, dan perbedaan media tanam yang digunakan.⁷

Dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Diana Eka Handayani, dkk (2023) dengan judul “aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% sayuran kale metode DPPH” didapati hasil kandungan vitamin C sebesar 152.18 mg/100 g, fenol 5414.61 mg/kg dan nilai IC₅₀ yang diperoleh adalah kategori kuat yaitu 99.397.⁸ Dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Neela Satheesh, dkk (2020) dengan judul “bio-active compounds, anti-nutritional factors, health beneficial properties” didapati kandungan flavonoid dari kale sebesar 661-892 mg / 100 g, ini menunjukkan bahwa kale mengandung sumber flavonoid yang baik.⁹

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, peneliti tertarik untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak sari murni sayur kale (*Brassica oleracea var. acephala*) pada penyajian mentah, rebus dan kukus dengan metode DPPH.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana aktivitas antioksidan pada sayur kale (*Brassica oleracea var. acephala*)?

1.3. Hipotesa

Terdapat aktivitas antioksidan sayur kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) pada penyajian mentah, rebus dan kukus metode DPPH.

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah

1. untuk mengetahui bagaimana aktivitas antioksidan sayur kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) pada penyajian mentah metode DPPH.
2. untuk mengetahui bagaimana aktivitas antioksidan sayur kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) pada penyajian rebus metode DPPH.
3. untuk mengetahui bagaimana aktivitas antioksidan sayur kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) pada penyajian kukus metode DPPH.

1.5. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat kepada:

1.5.1 Bagi Peneliti

Menambah wawasan peneliti tentang gambaran aktivitas antioksidan pada sayur kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) pada penyajian mentah, rebus dan kukus metode DPPH.

1.5.2 Bagi Masyarakat

Sebagai informasi kepada masyarakat tentang bagaimana cara penyajian sayur kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) yang baik dan benar.

1.5.3 Bagi Institusi

Sebagai tambahan literatur bagi institusi tentang aktivitas antioksidan pada sayur kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*).

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah sekelompok senyawa, golongan, atau molekul heterogen yang dapat berdiri sendiri dengan ciri elektron pada orbital atom terluarnya tidak memiliki pasangan, yang mengakibatkan radikal bebas sangat reaktif dan dengan cepat bereaksi dengan molekul lain dengan cara menangkap senyawa lain disekitarnya.¹⁰ Berdasarkan sifat reaktivitasnya, senyawa radikal bebas dibagi menjadi dua golongan berbeda yaitu senyawa yang bersifat radikal atau ROS (*reactive oxygen species*) dan senyawa yang bersifat non radikal. Senyawa yang bersifat radikal diantaranya radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$), radikal superoksida ($\text{O}_2\cdot$), radikal peroksil ($-\text{COOH}$), radikal alkoksi ($\text{RO}\cdot$) dan radikal nitrogen oksida ($\text{NO}\cdot$). Istilah “ROS” mengacu pada spesies oksigen reaktif, baik yang radikal bebas maupun tidak.¹¹ Sedangkan senyawa yang bersifat non radikal diantaranya hidrogen peroksida (O_2), hidroksil (OH), peroksil (ROO), hidrogen peroksida (H_2O_2), singlet oksigen (O_2) dan oksida nitrit (NO).¹²

Radikal bebas atau ROS memainkan peran ganda dalam sistem biologis dalam tubuh yang artinya dapat bermanfaat atau berbahaya bagi tubuh. Radikal bebas dalam tubuh merupakan produk sampingan dari proses oksidasi yang diproduksi dan dilepaskan oleh tubuh melalui respirasi dan metabolisme sel dengan melibatkan pembakaran sel dan radikal bebas ini memainkan peran penting sebagai mediator pengatur dalam proses pemberian sinyal. Namun, konsentrasi radikal bebas dapat meningkat jika terdapat paparan polusi udara, peradangan dan gaya hidup tidak sehat sehingga faktor-faktor ini mempengaruhi lipid seluler, protein ataupun asam nukleat sel.¹³ Dalam kondisi fisiologis, tubuh memiliki pertahanan antioksidan yang memadai untuk mengatasi produksi radikal bebas. Namun, spesies oksidan dapat menjadi racun ketika diproduksi secara berlebihan atau adanya kekurangan dalam pertahanan antioksidan alami dalam tubuh.

Dampak negatif dari radikal bebas ini timbul karena sifatnya yang dapat mengikat elektron dari molekul sel sehingga mampu merusak komponen-komponen sel yang penting dalam pertahanan tubuh.¹⁴

Proses fisiologis awal pembentukan radikal bebas dalam tubuh disebut prooksidan yang dilawan dengan mekanisme pertahanan endogen dengan menghasilkan zat atau molekul yang bekerja melawan kerusakan dari radikal bebas yang disebut antioksidan. Pada kondisi tubuh yang sehat proses prooksidan dapat dilawan dengan antioksidan, namun pada kondisi tertentu yang dapat mengakibatkan produksi ROS berlebihan keseimbangan tersebut dapat terganggu, suatu keadaan yang disebut stress oksidatif yang reaksinya memicu kerusakan pada sel baik dalam kondisi patologis (seperti penyakit kardiovaskular, neurodegeneratif serta kanker) maupun kondisi non-patologis seperti proses penuaan dan sebagainya. Stress oksidatif terjadi ketika radikal bebas yang dihasilkan lebih besar dibandingkan radikal yang dibuang oleh mekanisme pertahanan.¹⁵

2.2. Antioksidan

Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas dengan cara menghambat reaksi oksidasinya dan mengurangi efek negatif yang dihasilkan, seperti oksigen reaktif dan spesies nitrogen, pada fungsi fisiologis normal pada manusia.¹⁶ Di dalam tubuh, antioksidan dapat diperoleh dengan dua cara yaitu secara endogen dan eksogen. Antioksidan endogen diperoleh secara alami dari dalam tubuh contohnya superoksida dismutase, enzim katalase dan glutathione peroksidase namun kemampuan tubuh dalam memproduksi antioksidan sangat terbatas seiring bertambahnya usia, sedangkan antioksidan eksogen diperoleh dari makanan dan jumlahnya tidak terbatas contohnya tokoferol, asam askorbat, koenzim q10 dan karotenoid. Beberapa efeknya yaitu mengubah radikal bebas dari zat yang reaktif menjadi zat yang kurang reaktif, mengikat protein, dan bertindak menangkal radikal bebas.¹⁷

Antioksidan bekerja melalui beberapa cara, yaitu dengan menyumbangkan elektron pada senyawa pengoksidasi sehingga oksidan mempunyai efek penghambatan, bekerja menghambat atau mencegah oksidasi substrat pada reaksi berantai, melindungi sel-sel yang rusak akibat molekul tidak stabil atau radikal bebas, dan mencegah terjadinya pembentukan radikal bebas dengan mendonorkan elektron ke molekul radikal bebas sehingga reaksi berantai yang ditimbulkan oleh radikal bebas dapat dinetralisir bahkan dihentikan.⁴

2.3. Mekanisme Antioksidan

Perlindungan yang bertanggung jawab atas pertahanan utama tubuh disediakan oleh antioksidan endogen, dan sisanya disediakan oleh antioksidan eksogen. Antioksidan endogen disebut juga sebagai antioksidan primer sedangkan antioksidan eksogen masing-masing meliputi antioksidan sekunder, antioksidan tersier, dan pengikat oksigen (*oxygen scavenger*). Masing-masing antioksidan mempunyai peran yang berbeda-beda dalam menangkal radikal bebas berdasarkan jenisnya. Antioksidan primer adalah antioksidan yang bertindak sebagai molekul yang meminimalkan atau mengurangi pembentukan radikal bebas baru dengan mengganggu reaksi berantainya dan mengubah molekul radikal yang berkontak dengan tubuh menjadi molekul reaktif lemah. Antioksidan sekunder berperan untuk mengikat radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai dari senyawa radikal, mekanisme kerjanya adalah menghentikan reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas dengan demikian radikal bebas tidak menyerang atau bereaksi dengan komponen seluler secara langsung atau dapat mengurangi kerusakan sel yang parah. Antioksidan tersier terlibat dalam proses biomolekuler, seperti memperbaiki kerusakan jaringan dan sel yang diakibatkan oleh radikal bebas, sedangkan *oxygen scavenger* bertindak untuk mencegah terjadinya oksidasi melalui pengikatan terhadap oksigen.^{15,18}

Mekanisme kerja antioksidan yang dapat digunakan untuk mencegah atau menghentikan reaksi berantai dari radikal bebas, melalui empat

mekanisme reaksi yaitu pelepasan hidrogen, pelepasan elektron, penambahan asam lemak ke cincin aromatik pada antioksidan dan pembentukan ikatan kompleks antara lemak dan cincin aromatik yang mengandung antioksidan. Pada dasarnya antioksidan akan membentuk peroksida aktif yang mana ini akan terbentuk ketika oksigen bebas di udara akan memecah ikatan rangkap pada asam lemak tidak jenuh, kemudian radikal bebas akan bereaksi dengan oksigen membentuk peroksida aktif. Selanjutnya peroksida teraktivasi bereaksi dengan ikatan rangkap maka ketika dilakukan penambahan antioksidan peroksida aktif dapat bereaksi dengan antioksidan tersebut dan mencegah pembentukan molekul radikal bebas.¹⁹

2.4. Sayur Kale

Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) adalah sayuran yang satu famili dengan sayur kubis, sawi, brokoli dan kailan yaitu famili *Brassicaceae*. Kale juga dikenal sebagai Si Ratu Sayuran karena memiliki kandungan nutrisi dan berbagai manfaat yang penting bagi tubuh manusia.²⁰ Sekilas, kale terlihat mirip dengan brokoli dan kubis. Berbedanya dengan daun lainnya, daun sejati kale tidak berkepala dan berwarna hijau ataupun ungu kebiruan. Jenis kale bisa dibedakan dengan melihat apakah daunnya yang keriting atau kale left.^{7,21}

Kata kale berasal dari bahasa Belanda yang berarti “kubis petani” yaitu tanaman hortikultura yang ditanam secara reseptif dan modern dan tanpa memperhatikan musim. Kale merupakan tanaman kubis yang berasal dari Mediterania Timur atau Asia. Kale adalah tipe sayur kelas dunia yang memiliki nutrisi yang tinggi. Kale bisa dikonsumsi dalam bentuk mentah, di buah salad ataupun diolah menjadi jus, jika dikonsumsi dengan cara dimasak maka kandungan nutrisinya akan menurun.^{21,22}

2.4.1. Klasifikasi Sayur Kale

Dalam dunia tumbuh-tumbuhan kale termasuk kedalam famili kubis-kubisan, klasifikasi sayur kale adalah sebagai berikut:²¹

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledone</i>
Famili	: <i>Cruciferae</i>
Ordo	: <i>Rhoeadales</i>
Genus	: <i>Brassica</i>
Spesies	: <i>Brassica oleracea var. acephala</i>



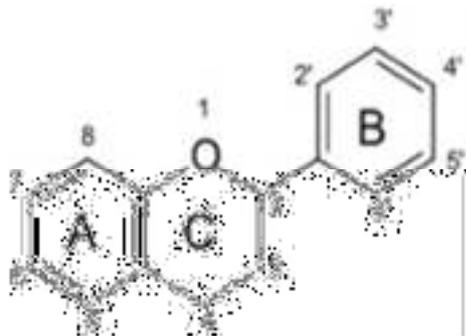
Gambar 2.1. Sayur Kale²³

2.4.2. Nutrisi Sayur Kale

Sayur kale mengandung nutrisi diantaranya karbohidrat, lemak, dan protein, setiap 100 gramnya. Selain itu, kale juga mengandung senyawa yang disebut flavonoid dan fenol yang bertindak sebagai antioksidan. Senyawa ini mempunyai efek yang sangat baik manfaatnya bagi kesehatan tubuh baik dalam pencegahan maupun sebagai pemulihan bagi berbagai penyakit.²⁴

a. Flavonoid

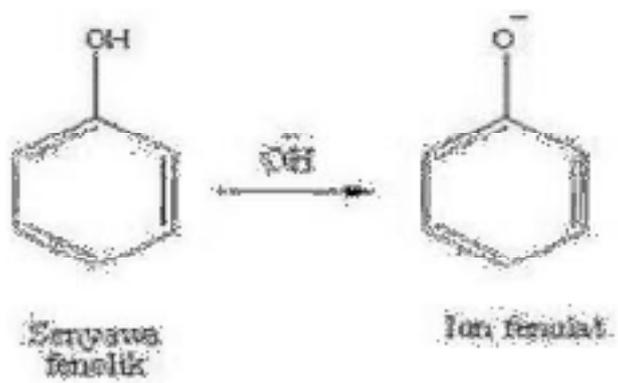
Flavonoid adalah senyawa antioksidan dari kelompok polifenol yang berfungsi untuk menghasilkan metabolit sekunder yang bertindak mencegah radikal bebas. Flavonoid mempunyai sifat yang dapat membentuk seperti cincin dari kombinasi logam dan molekul organik yang bisa mencegah atau menghambat akses oksidasi.²⁵ Flavonoid adalah modulator steroidogenesis pada kanker yang bergantung pada hormon, karena senyawa ini dapat berikatan dengan reseptor estrogen dan DNA. Flavonoid juga dapat mengkelat ion logam, seperti Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , mengkatalisis pengangkutan elektron, dan menetralkan radikal bebas.²⁶



Gambar 2.2. Struktur Senyawa Flavonoid²⁷

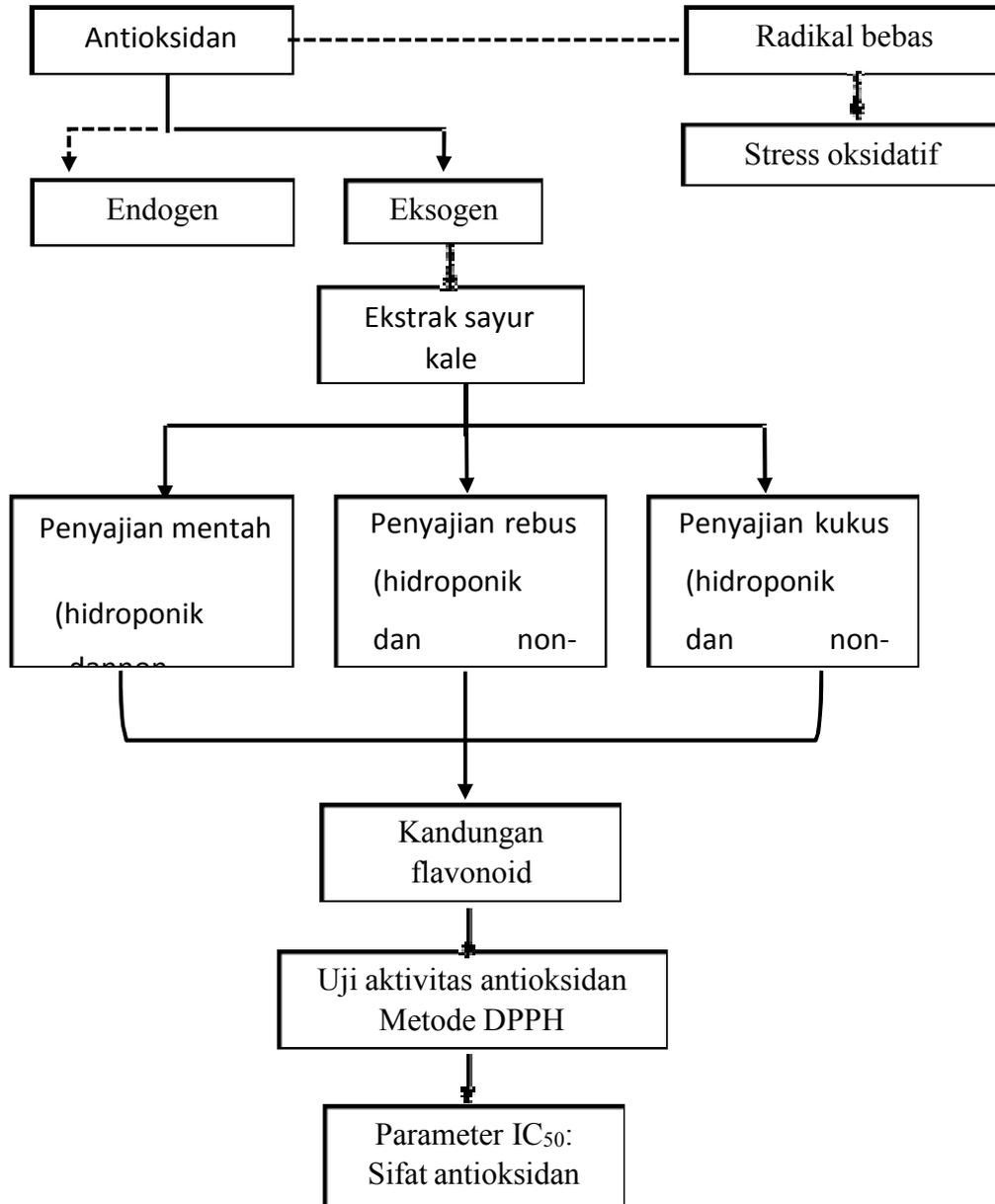
b. Fenol

Fenol adalah senyawa metabolit sekunder dengan kombinasi mono dan polisakarida yang mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi dan gugus hidroksil (OH), dimana gugus-gugus OH yang ada pada struktur senyawa ini akan memberikan atom OH sebagai penyumbang radikal bebas yang berperan sebagai antioksidan, anti kanker, antiinflamasi dan lain sebagainya. Senyawa fenolik bekerja dengan cara memutus rantai radikal bebas sehingga dapat menurunkan stress oksidatif.^{28,29}

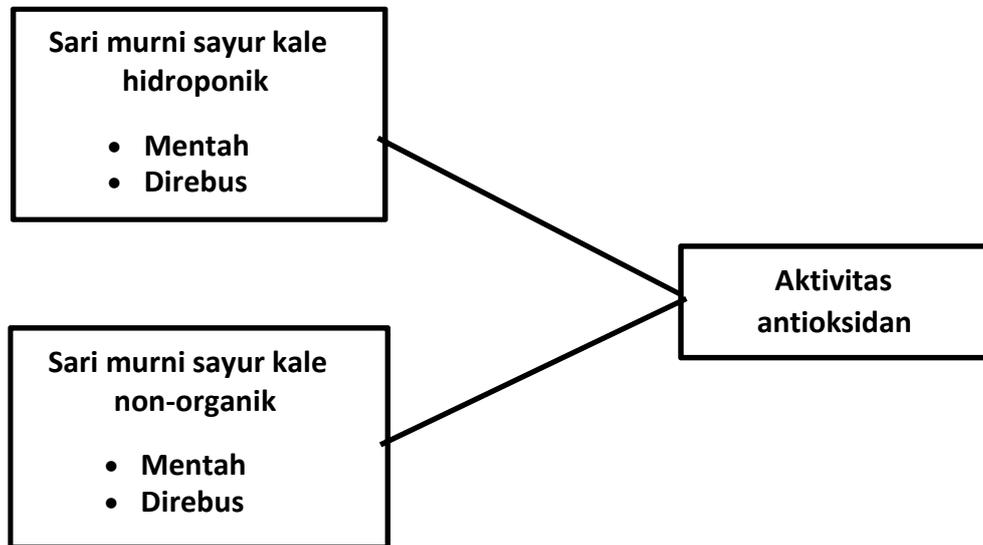


Gambar 2.3. Struktur Senyawa Fenol³⁰

2.5. Kerangka Teori



2.6. Kerangka Konsep



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni, yaitu penelitian yang dikerjakan di laboratorium dengan melakukan pengamatan aktivitas antioksidan pada sayur kale (*Brassica oleracea* var. *Acephala*) dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1. Tempat Penelitian

Pembuatan ekstrak atau sari murni sayur kale (*Brassica oleracea* var. *Acephala*) dan pemeriksaan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH UV-Vis dilakukan di Laboratorium Analisis Fakultas Farmasi Sumatera Utara.

3.2.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan 21 September – 5 Oktober 2023

3.3. Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah sayur kale hidroponik dan non-organik dalam kondisi segar dengan penyajian mentah, rebus dan kukus metode DPPH dilakukan 2 kali pengulangan.

3.4. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode pengujian yang sangat umum dan banyak digunakan untuk mengidentifikasi senyawa dalam analisis kimia pada fase padat dan cair melalui penyerapan foton. Persyaratan mutu dalam menetapkan standar dan kualitas kinerja hasil spektrofotometri dalam analisa kimia ditentukan oleh acuan ISO 17025, Good Laboratory Practice (GLP).³¹ Dalam spektrofotometri UV-Vis, proses penyerapan cahaya yang melibatkan interaksi antara atom atau molekul

merupakan prinsip dasarnya, dimana atom serta molekul yang berinteraksi dengan cahaya. Perpaduan prinsip spektrofotometri Ultraviolet dan Visible dikenal sebagai spektrofotometri ultraviolet-visible (UV-Vis). Pada pengujian menggunakan alat spektrofotometri menggunakan dua sumber cahaya yang berbeda yaitu sumber cahaya UV dan sumber cahaya Vis. Spektrofotometri UV-Vis didasarkan pada hukum Lambert-Beer, artinya penyerapan cahaya dalam suatu senyawa terjadi ketika cahaya monokromatik ditransmisikan melalui senyawa tersebut. Pada bagian dalam spektrofotometri terdapat kaca yang dapat membagi sumber cahaya menjadi dua bagian.³² Pengujian ini diawali setelah pengujian metode DPPH yaitu perubahan warna menjadi kuning. Perubahan warna tersebut yang kemudian akan diukur menggunakan alat spektrofotometri, berkurangnya intensitas warna yang dihasilkan terjadi karena kurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*). peristiwa tersebut terjadi ketika suatu zat menangkap elektron antioksidan, yang mengakibatkan tidak adanya kesempatan untuk elektron beresonansi.³³

3.5. Penentuan Operating Time

Untuk memperoleh waktu yang optimal bagi DPPH dalam merespon sampel maka diperlukan penentuan *operating time* yaitu untuk mengetahui waktu DPPH dalam memproses atau bereaksi terhadap sampel yang akan diuji. Untuk penentuan *operating time* DPPH dan waktu proses sampel pengukuran serapan dilakukan dalam proses 60 menit. Ciri-ciri secara visualnya, pada larutan yang diamati terdapat perubahan warna dari ungu menjadi kuning.³⁴

3.6. Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) merupakan cara yang mudah dan cepat untuk mengukur aktivitas antioksidan karena cara ini sangat sederhana dan hanya memerlukan ukuran sampel yang kecil.³⁵ Pada metode ini larutan DPPH yang akan berfungsi sebagai radikal bebas yang

mendeteksi senyawa nitrogen tidak stabil, larutan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) ditandai dengan warna ungu tua.³³ Untuk mengetahui aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan menyiapkan larutan DPPH kemudian mengukur panjang gelombang maksimum. Penentuan panjang gelombang dilakukan dengan tujuan memperoleh panjang gelombang yang mempunyai serapan paling baik. Setelah mencapai panjang gelombang maksimum, langkah selanjutnya adalah mengukur serapan sampel pada setiap konsentrasi dan menghitung persen penghambatan.³⁶

3.7. Penentuan Nilai IC₅₀

Dalam penelitian ini, uji antioksidan memakai parameter IC₅₀ yang menunjukkan kemampuan penghambatan 50% radikal bebas dengan nilai tertentu tergantung konsentrasi sampel (ppm). Semakin tinggi aktivitas antioksidan suatu konsentrasi sampel maka perolehan nilai IC₅₀ akan semakin rendah dan sebaliknya semakin tinggi nilai IC₅₀ maka aktivitas antioksidannya semakin rendah. Menurut Yulianti (2018), klasifikasi antioksidan IC₅₀ terdiri dari: < 50 ppm (antioksidan sangat kuat), 50-100 ppm (antioksidan kuat), 101-250 ppm (antioksidan sedang), 250-500 ppm (antioksidan lemah), > 500 ppm (antioksidan sangat lemah).³⁷

3.8. Instrumen Penelitian

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil, batang pengaduk, beaker glass, *juicer extractor*, bola hisap, corong gelas, gelas ukur, kertas perkamen, kertas saring, labu ukur 5 ml ; 25ml ; 100ml , matt pipet, neraca analitik, pipet tetes, spuit 1 ml ; 3ml, tisu, serbet, spatula, cawan, hot plate, oven, spektrofotometri UV-Vis, panci listrik goto *electric multifunction minipan HOPO*.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam pengujian ini adalah ekstrak sari murni sayur kale (*Brassica oleracea* var. *Acephala*) kental, larutan DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl), methanol p.a, etanol, HCl pekat, amyl alkohol, bubuk magnesium, air panas mendidih.

3.9. Prosedur Kerja

1. Mengurus surat izin penelitian di laboratorium terpadu FK USU
2. Survey sayur kale di pasar tradisional dan swalayan.
3. Pembelian sayur kale yang segar dengan metode tanam : hidroponik dan non-organik
4. Pembersihan sayur kale dari debu, kotoran, atau tanah, sehingga harus dicuci dengan air mengalir secara berulang-ulang lalu ditiriskan.
5. Persiapan sampel:
 - a. Penyajian mentah: Sayur kale yang sudah dicuci bersih setelahnya ditiriskan, kemudian dikeringanginkan dan dihaluskan menggunakan juice extractor, kemudian sari yang didapat disaring menggunakan kertas saring di cawan lalu dipanaskan dengan hotplate hingga sedikit mengering.³⁸
 - b. Penyajian rebus: Sayur kale yang sudah dicuci bersih dimasukan kedalam air mendidih dengan suhu 100°C, lalu ditiriskan. Setelah itu sampel dikeringanginkan dan di haluskan menggunakan juice extractor, kemudian sari yang didapat disaring menggunakan kertas saring di cawan lalu dipanaskan dengan hotplate hingga sedikit mengering.³⁸
 - c. Penyajian kukus: Sayur kale yang sudah dicuci bersih dimasukan ke dalam dandang dan di kukus selama 15 menit, lalu ditiriskan. Setelah itu sampel dikeringanginkan dan di haluskan menggunakan juice extractor, kemudian sari yang didapat disaring menggunakan kertas saring di cawan lalu dipanaskan dengan hotplate hingga sedikit mengering.³⁸

6. Pembuatan ekstrak sari murni sayur pakcoy oleh peneliti dan tim laboratorium Farmasi Analisis USU.

Setelah sampel sedikit mengering kemudian ditambahkan etanol p.a secukupnya lalu diaduk dan ditunggu selama 3 menit, setelahnya saring kembali dan dipanaskan lagi menggunakan hotplate hingga ekstraknya kental. Kemudian ditimbang sebanyak 3 kali. menggunakan neraca analitik dengan masing – masing sampel 25 mg.

7. Uji Flavonoid:

Campurkan 0,2 g logam Mg ke dalam 15 ml ekstrak sayur kale lalu ditetesi 2 tetes HCl pekat dan 3 tetes amy alkohol dan diaduk dengan kuat, jika terdapat perubahan warna menunjukkan adanya flavonoid dalam sampel.

8. Uji aktivitas antioksidan:³⁹

- 8.1. Pembuatan Larutan Induk Baku I DPPH dengan Konsentrasi 200 g/mL

Timbang 20 mg DPPH ke dalam labu ukur 100 ml, larutkan dalam metanol dan dicukupkan sampai tanda batas. Lanjutkan dengan menghomogenkan larutan hingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 200 ppm (Part Per Million). ppm merupakan satuan untuk mengukur kepekatan larutan.

- 8.2. Pembuatan LIB II DPPH dengan Konsentrasi 40 pg/mL

Pindahkan 5 ml larutan DPPH dari konsentrasi 200 g/ml ke dalam labu ukur 25 ml, dan tambahkan metanol hingga garis tanda untuk menghomogenkan (konsentrasi 40 pg/ml).

- 8.3. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH

Larutan DPPH dalam konsentrasi 40 mg/ml dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dimasukkan ke dalam spektrofotometer. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 400-800 nm.

- 8.4. Penentuan Waktu Kerja (Operating Time)

Larutan DPPH dalam konsentrasi 40 ppm dimasukkan ke dalam kuvet dan serapannya diukur setiap menit selama 60 menit pada panjang gelombang 516 nm dan diamati waktu ketika larutan mulai

menunjukkan serapan stabil, yang akan digunakan sebagai pengukuran waktu kerja (operating time) untuk prosedur selanjutnya.

8.5. Pembuatan LIB Sampel Uji

Sebanyak 25 mg setiap ekstrak ditimbang kemudian mencampurkannya dengan metanol ke masing-masing labu ukur 25 ml kemudian mencukupkan volumenya sampai garis tanda (konsentrasi 1000 ppm)

8.6. Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas Sari Murni Sayur Kale Hidroponik dan Non-organik Dengan Penyajian Mentah, Rebus dan Kukus

Larutan induk dimasukkan kedalam labu ukur 5 ml dengan dipipet sebanyak 0,5 ml; 0,75 ml; 1 ml; 1,25 ml; 1,5 ml (untuk memperoleh konsentrasi 100 g/ml, 150 pg/ml, 200 pg/ml, 250 pg/ml, 300 pg/ml), kemudian tambahkan 1 ml larutan DPPH dengan konsentrasi 200 g/ml ke masing-masing labu ukur kemudian dicukupkan volumenya dengan metanol sampai garis tanda, diinkubasi selama 30 menit, lalu diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Visibel.

8.7. Penentuan Nilai IC_{50}

Nilai IC_{50} merupakan angka yang menunjukkan tingkat konsentrasi sampel uji (ug/mL) yang menurunkan DPPH hingga 50% (dapat menghambat/mengurangi proses oksidasi sebesar 50%) sehingga efektif menghambat oksidasi. Nilai 0% berarti tidak ada aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti larutan uji harus diencerkan dalam larutan yang sama untuk menentukan batas konsentrasi aktif. Hasil perhitungan disubstitusikan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak (Ng/ml) sebagai sumbu horizontal (sumbu X) dan nilai % peredaman (antioksidan) sebagai sumbu vertikal (sumbu Y).

9. Mencatat hasil dan konsultasi pengolahan data dengan tenaga ahli, untuk mendapatkan nilai IC50 dari masing-masing sampel.

3.10. Identifikasi Variabel

Variabel penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dan variabel terikat yaitu ekstrak sari murni sayur kale (*Brassica oleracea* var. *Acephala*).

3.11. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional Variabel	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Ekstrak sari murni sayur kale (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Acephala</i>) hidroponik dan non-organik mentah	Sayur kale dicuci bersih dan diekstrak dengan menggunakan <i>juicer extractor</i>	25 mg ekstrak sari murni kental, dilarutkan methanol pada labu ukur 25 ml	Larutan induk dipipet 0,5 ml; 0,75 ml; 1 ml; 1,25 ml; 1,5 ml pada labu ukur 5 ml dan dicukupkan hingga garis tanda dengan metanol	Rasio
2.	Ekstrak sari murni sayur kale (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Acephala</i>)	Sayur kale direbus kedalam air mendidih dengan suhu 100 °C menit dan diekstrak	25 mg ekstrak sari murni kental, dilarutkan methanol pada labu ukur 25 ml	Larutan induk dipipet 0,5 ml; 0,75 ml; 1 ml; 1,25 ml; 1,5 ml pada labu ukur 5 ml dan dicukupkan	Rasio

	hidroponik dan non-organik rebus	dengan menggunakan <i>juicer</i>				hingga garis tanda dengan metanol		
3.	Ekstrak sari murni sayur kale (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Acephala</i>) hidroponik dan non-organik kukus	Sayur kale dikukus selama 15 menit diekstrak dengan menggunakan <i>juicer</i>	25 mg ekstrak sari murni kental, dan dilarutkan methanol pada labu ukur 25 ml	25 mg ekstrak sari murni kental, dan dilarutkan methanol pada labu ukur 25 ml	Larutan induk dipipet 0,5 ml; 0,75 ml; 1 ml; 1,25 ml; 1,5 ml pada labu ukur 5 ml dan dan dicukupkan hingga garis tanda dengan metanol			Rasio
4.	Aktivitas antioksidan	Aktivitas antioksidan diteliti dengan metode DPPH	Spektrofotometer UV-Vis	Nilai IC ₅₀ : 50-100 (Kuat) 100-250 (Sedang) >250 (Lemah)				Ordinal ppm

3.12. Analisa Data

Data hasil penelitian akan disajikan dalam bentuk tabel, gambaran aktivitas antioksidan sayur kale menggunakan aplikasi *microsoft excel*. Untuk menentukan aktivitas antioksidan suatu sampel, maka diperlukan nilai IC₅₀ dengan menggunakan rumus persamaan garis regresi linier yang diperoleh dari plot antara nilai aktivitas peredaman radikal bebas (% peredaman) dengan konsentrasi.

fBesarnya % peredaman DPPH dapat dihitung dengan:

$$\% \text{ Peredaman DPPH: } \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100$$

kemudian dari hasil yang didapatkan dilakukan perhitungan untuk mencari nilai

IC₅₀:

$$a = \frac{((\sum XY) - \frac{(\sum X)(\sum Y)}{n})}{(\sum X^2) - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$

$$b = \bar{Y} - a\bar{X}$$

rumus nilai IC₅₀ $Y = aX + b$

Klasifikasi nilai IC₅₀:

- a. < 50 ppm : Sifat antioksidan sangat kuat
 - b. 50 - 100 ppm : Sifat antioksidan kuat
 - c. 101 - 250 ppm : Sifat antioksidan sedang
 - d. 250 – 500 ppm : Sifat antioksidan lemah
- > 500 ppm : Sifat antioksidan sangat lemah