

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan skema desain penelitian sebagai berikut.

1. Pengaruh metode ekstraksi terhadap kadar flavonoid total ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dengan pembanding kuersetin.
2. Pengaruh metode ekstraksi terhadap kadar flavonoid total ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dengan pembanding rutin.
3. Perbandingan kadar flavonoid total ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) total masing-masing dengan pembanding kuersetin dan rutin.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian
 - a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas Sains dan Matematika Departemen Biologi Universitas Diponegoro Semarang.
 - b. Pembuatan ekstrak, uji Kualitatif dan Kuantitatif buah Parijoto dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo
 - c. Uji aktivitas Kadar Flavonoid Ekstrak buah Parijoto dilakukan di Laboratorium Instrumen Universitas Ngudi Waluyo

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April – Juli 2021

Subjek Penelitian

a. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah tiga metode ekstraksi, yakni metode Maserasi, Digesti dan Refluks.

b. Variabel Terikat

Variabel Terikat dalam penelitian ini adalah kadar Flavonoid total ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa*)

C. Definisi Operasional

Berikut definisi operasional yang ada dalam penelitian :

1. Buah Parijoto merupakan tanaman asal bandungan yang mengandung senyawa flavonoid dan secara tradisional buah parijoto biasa digunakan sebagai obat sariawan sedangkan daunnya dapat digunakan sebagai obat antiradang
2. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi dingin dengan suhu kamar (27°C) yang digunakan untuk menarik senyawa flavonoid pada buah parijoto.
3. Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan *continue*) dengan pemanasan dengan 50°C.
4. Refluks adalah salah satu metode ekstraksi panas menggunakan suhu 50°C dengan titik didih etanol 78,4°C. Bahan yang akan diekstraksi direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat

pendingin tegak, lalu dipanaskan sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan diembunkan dengan pendingin tegak dan akan kembali.

5. Uji Kualitatif (uji warna) adalah proses mengidentifikasi suatu senyawa kimia dalam larutan atau sampel dengan menggunakan reagen tertentu yang ditandai dengan perubahan warna.
6. Uji Kuantitatif Spektrofotometri Uv – Vis adalah proses mengukur transmittan atau absorban suatu sampel yang didapatkan Panjang gelombang kuersetin dan rutin 413,10 dan 362,80 nm.
7. Flavonoid adalah golongan senyawa phenolik yang mengandung C₁₅ terdiri atas dua inti fenolat yang dihubungkan dengan tiga satuan karbon. Struktur umum flavonoid juga digambarkan sebagai deretan senyawa C₆-C₃-C₆.

D. Pengumpulan Data

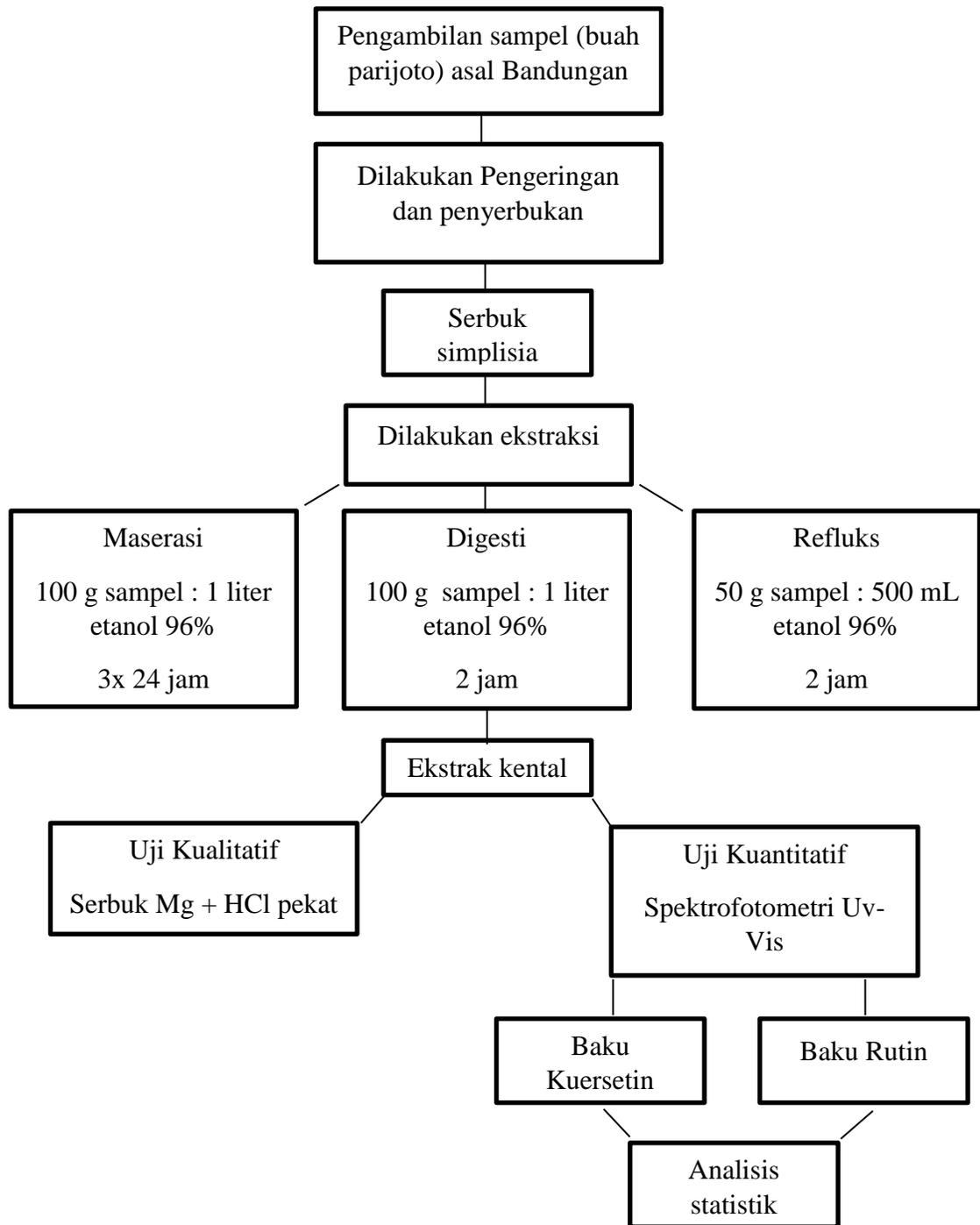
1. Alat

Spektrofotometer Uv – Vis (Shimadzu UV-1800), Timbangan analitik (Matrix), magnetic stirrer (Malvern), rotary evaporator (Ika RV10 Digital V), seperangkat alat gelas (Pyrex), Pisau, blender, ayakan no mesh 100, oven, pipet volume, pipet tetes, 1 set alat refluks, Hotplate (IKA C-MAG HS7), statif, klem, neraca digital, thermometer, wadah maserasi, corong *bucher*, kertas saring Whatman, toples kaca, Spektrofotometer, Erlenmeyer, kain kasa steril LAB (Pyrex) 500 ml, labu ukur 10 ml, labu ukur 50 ml, mikropipet, tabung reaksi, wadah tabung reaksi.

2. Bahan

Bahan utama buah parijoto asal Bandungan daerah Baradukun, Baran, Kec. Ambarawa, Semarang. bahan kimia yang digunakan etanol (p.a), metanol (p.a), HCL pekat (Merck), serbuk $MgSO_4$, amil alcohol dan aquades (Brratachem), Kuersetin, $AlCl_3$ 10%, asam asetat 5%,, Kalium asetat, Natrum Karbonat, NaOH.

E. Prosedur penelitian



Bagan 3.1 Alur Penelitian

1. Pembuatan Simplisia

Tahap pertama pembuatan simplisia, buah parijoto (*Medinilla speciosa*) segar yang diperoleh dari daerah Bandungan Ungaran disortasi basah agar buah bersih dari pengotor kemudian dirajang dan dikeringkan menggunakan sinar matahari secara langsung dan tutup dengan kain hitam selama kurang lebih 3x 24 jam. Buah yang telah kering selanjutnya disortasi kering dengan cara dipisahkan kembali dari pengotor. Buah kemudian diblender agar menjadi serbuk dan diayak menggunakan ayakan dengan no mesh 100 karena ayakan 100 mesh relative halus (Supomo et al., 2019)

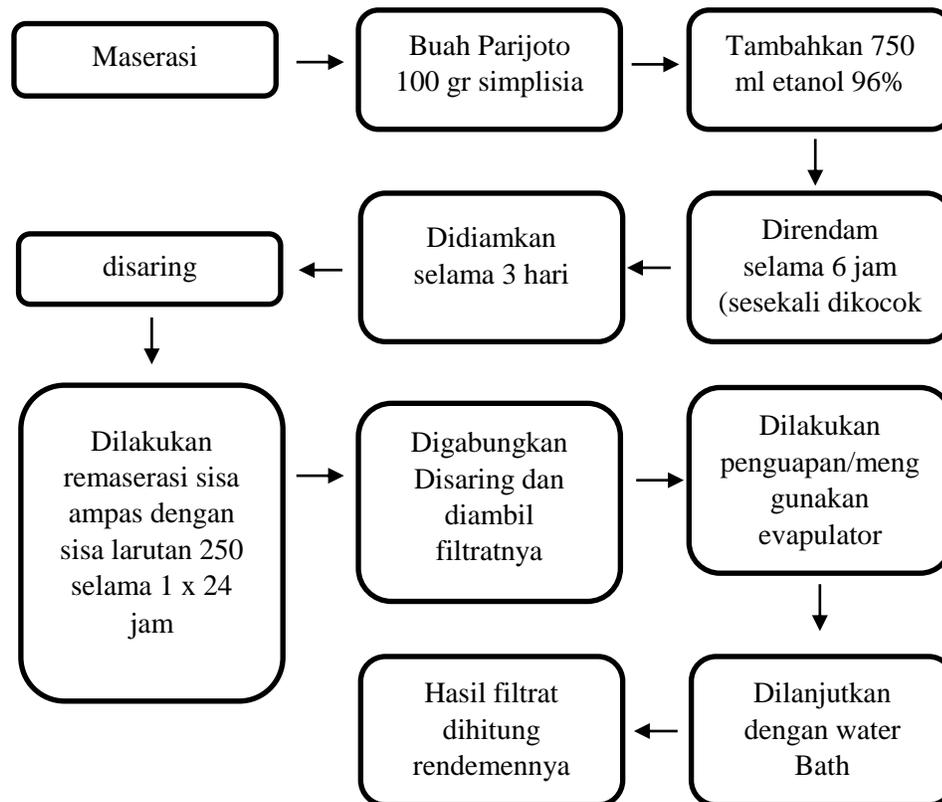
2. Pembuatan Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* .)

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah buah segar parijoto (*Medinilla spesiosa* .). Pada buah parijoto (*Medinilla spesiosa* .) terdapat biji sangat kecil dan banyak sehingga dalam penelitian ini biji tidak dipisahkan dari buahnya. Sampel yang diambil adalah buah yang berwarna ungu kemudian disortasi untuk dipisahkan dari kotoran atau bahan asing.

Tahap kedua dilakukan ekstraksi, pada penelitian ini simplisia di ekstrak menggunakan 3 metode ekstraksi yaitu maserasi, digesti dan refluks. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96% dengan perbandingan serbuk dan cairan penyari 1:10 (Kunarto & Sani, 2020). Ekstrak sebanyak 100 gram dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 1000 liter Setelah difiltrasi, maserat kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental dengan bobot konstan.

a. Metode Maserasi

Serbuk simplisia sebanyak 100gram diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 750 ml selama 3 hari sambil sesekali dilakukan pengadukan setiap 8 jam sekali supaya penarikan senyawa aktif lebih optimal, Filtrat hasil ekstraksi disaring menggunakan corong buchner dengan kertas saring Whatman, Kemudian sisa ampas diremaserasi dengan sisa larutan 250 ml selama 1 x 24 jam dan diaduk. Hasil ekstraksi digabungkan dan disaring menggunakan corong buchner dan vacum untuk memisahkan maserat dengan filtrat. Selanjutnya dilakukan penguapan menggunakan evaporator dan di dapatkan ekstrak kental. (Supomo et al., 2019).

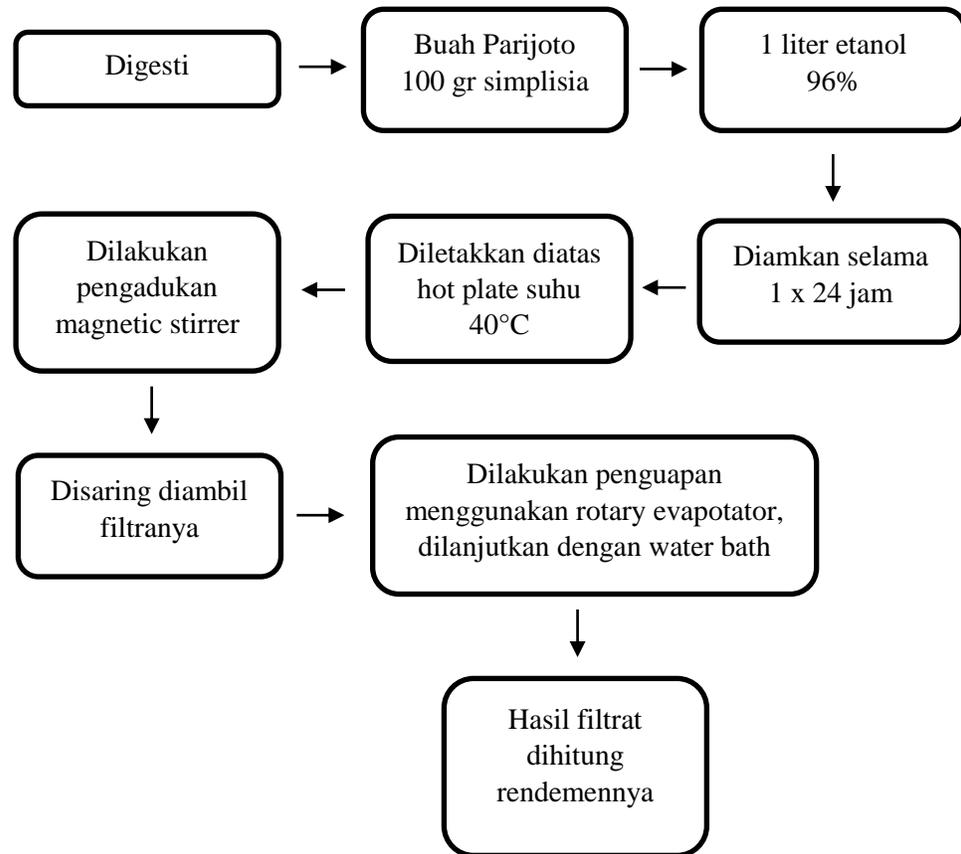


Bagan 3.2 Metode Maserasi

b. Metode digesti

Serbuk simplisia sebanyak 100 gram dimasukkan dalam wadah kaca dan di tambahkan larutan etanol 96% sebanyak 1 liter selama 24 jam dilakukan secara bertahap. Kemudian diletakkan diatas hot plate, atur suhu 40°C - 50°C yang diukur menggunakan *thermometer*. Perlakuan pengadukan sampel menggunakan magnetic stirrer dilakukan dengan kecepatan ± 1000 rpm selama 2 jam. Hasil ekstraksi disaring menggunakan corong *buchner* dan vacuum untuk memisahkan maserat dengan filtrat. Hasil ekstraksi disaring menggunakan corong *buchner* dan

vacum untuk memisahkan maserat dengan filtrat. Selanjutnya dilakukan penguapan menggunakan evaporator dan di dapatkan ekstrak kental dan diulangi seluruh proses sebanyak 3 kali. (Supomo et al., 2019).

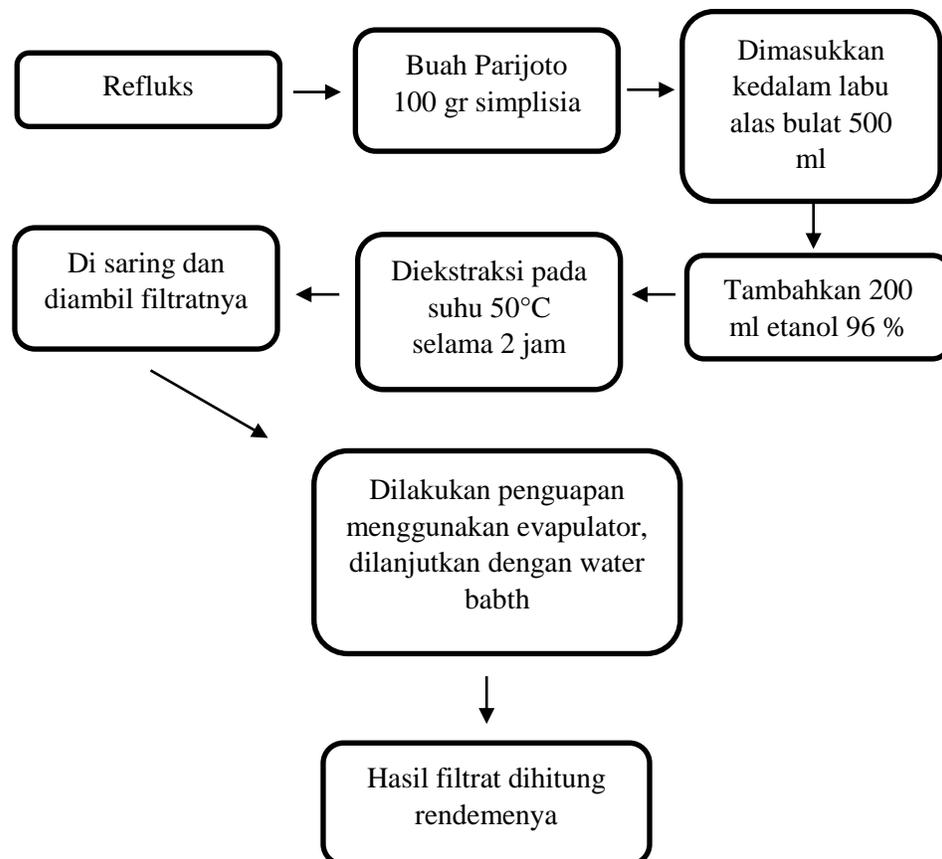


Bagan 3.3 Metode Digesti

c. Metode Refluks

Serbuk simplisia sebanyak 100 gram, dibagi menjadi 4 bagian sebanyak 25 g serbuk simplisia, dimasukkan kedalam labu alas bulat 500 ml, kemudian ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 250 ml dilakukan 4 kali secara bertahap. Kemudian sampel diekstraksi pada suhu

50°C dengan titik didih etanol 78,4 °C dilakukan 4 kali selama 2 jam. Larutan yang sudah selesai diekstraksi disaring dengan kain kasa steril dan menggunakan kertas saring. (Susanty & Bachmid 2016). Hasil ekstraksi disaring menggunakan corong buchner dan vacuum untuk memisahkan masekat dengan filtrat. Selanjutnya dilakukan penguapan menggunakan evaporator dan di dapatkan ekstrak kental. (Supomo et al., 2019)

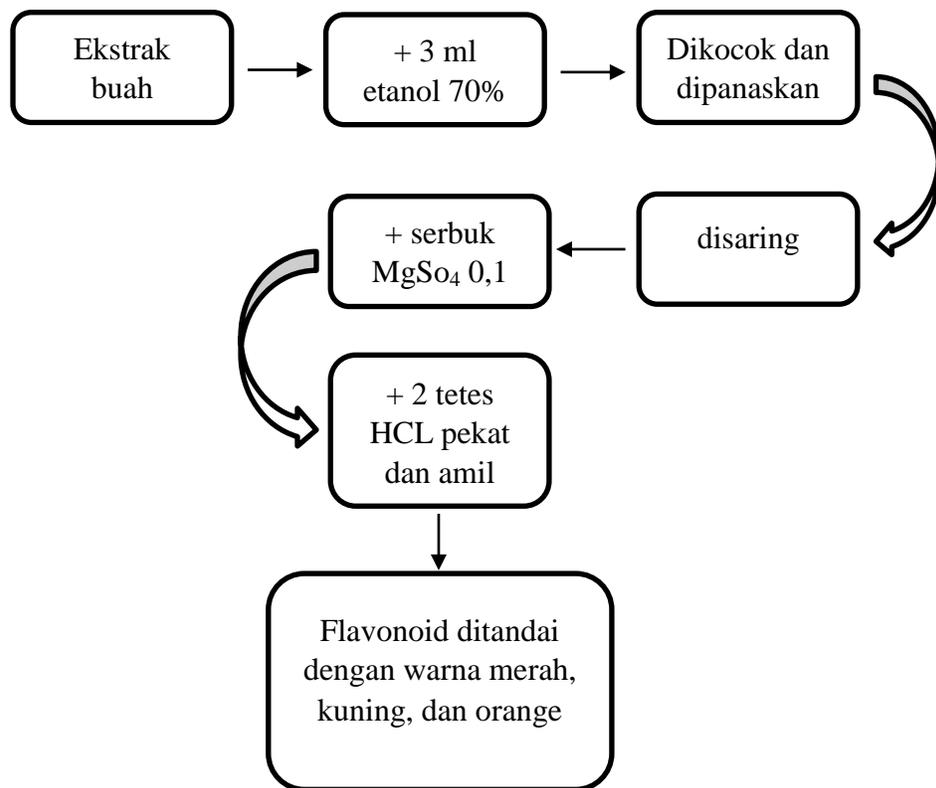


Bagan 3.4 Metode Refluks

F. Identifikasi Flavonoid

1. Uji Kualitatif pada Flavonoid (Pereaksi warna)

Sebanyak 3 ml larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan $MgSO_4$ 0,1 gr dan 5 tetes HCl pekat. Hasil positif mengandung flavonoid jika menghasilkan warna kuning, orange atau merah (Nafisah, Tukiran, Suyatno, & Hidayati, 2014)



Bagan 3.5 Uji Kualitatif pada Flavonoid (Pereaksi Pewarna)

2. Uji Kuantitatif Pada Flavonoid Pembanding Kuarsetin

a. Pembuatan larutan baku kuarsetin

Ditimbang sebanyak 10 mg baku standar kuarsetin di encerkan 1000 ppm kemudian dibuat beberapa konsentrasi yaitu 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a 96%. Larutan stok dipipet sebanyak 1 mL dan dicukupkan volumenya sampai 10 mL (Sari & Ayuchecaria, 2017).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan kuarsetin 10 ppm diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Lakukan pembacaan dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400-500 nm (Sudewi & Pontoh, 2018)

c. Penentuan Operating Time

Larutan kuarsetin 10 ppm diambil sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah diperoleh dengan interval pada waktu 1 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil selama 30 menit (Sari & Ayuchecaria, 2017).

d. Penentuan Kurva Baku Kuarsetin

Dari Larutan seri kadar dibuat dengan menggunakan kuarsetin sebagai baku standar. Dibuat seri kadar sebesar 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm. Sebanyak 1 mL larutan seri kadar dari masing-masing konsentrasi

dimasukkan, direaksikan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Didiamkan selama 16 menit pembacaan absorbansi seri kadar dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Sari & Ayuhecaria, 2017)

e. Penentuan Flavonoid Total

Tiga sampel ekstrak etanol 96% buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm kemudian diencerkan 100 ppm diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5% didiamkan selama operating time. Dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang maksimum dengan 3 kali Replikasi. (Sari & Ayuhecaria, 2017)

3. Uji Kuantitatif Pada Flavonoid Pembanding Rutin

a. Pembuatan Larutan baku Rutin

Sebanyak 10 mg rutin di encerkan 1000 ppm menggunakan methanol 70% p.a kemudian dibuat beberapa konsentrasi yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm (Andriani & Murtisiwi, 2018)

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dari 6 ppm diambil sebanyak 25 μL Li dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL kemudian ditambah dengan 4,0 mL akuades dan 0,3 mL NaNO_2 10% didiamkan selama 6 menit, kemudian ditambah 4,0 mL NaOH 10% dan akuades

sampai tanda. (Vifta, Shutiawan, Maulidya, 2021). Absorbansi diukur pada panjang gelombang 300- 500nm. (Semu, 2004)

c. Penentuan Operating Time

Penentuan operating time (OT) Larutan induk (Li) rutin 1% dalam metanol p.a sebanyak 25 μ L dimasukkan dalam labu takar 10 mL kemudian ditambah 4 mL akuades dan 0,3 mL NaNO₂ 10% didiamkan selama 6 menit, kemudian ditambah AlCl₃ 10% sebanyak 0,3 mL didiamkan selama 5 menit, ditambah 4,0 mL NaOH 10% dan akuades sampai tanda. dilanjutkan dengan penentuan waktu operasional pada menit ke 1 sampai dengan 30. (Vifta, Shutiawan, Maulidya, 2021)

d. Penentuan Kurva Baku rutin

Pengukuran Larutan kurva baku rutin (dalam methanol p.a) dibuat dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Dari masing-masing konsentrasi tersebut, ditambahkan 4,0 mL akuades, 0,3 mL NaNO₂ 10%, dan didiamkan selama 6 menit, kemudian ditambah AlCl₃ 10% sebanya 0,3 mL, didiamkan selama 5 menit, selanjutnya ditambah 4,0 mL NaOH 1% dan akuades sampai tanda batas dan dilanjutkan dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis sesuai panjang gelombang maksimal dan waktu operasional yang diperoleh (Vifta, Shutiawan, Maulidya, 2021)

e. Penentuan Flavonoid Total

Tiga sampel ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* L.) dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm kemudian di encerkan ke 100 ppm diambil sebanyak 1 ml. pengukuran dilanjutkan sebagaimana dilakukan pada pembuatan kurva baku, Diamkan selama operating time. Dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang maksimum dengan 3 kali Replikasi (Sari & Ayuhecaria, 2017).

G. Analisis Data

1. Analisis data dari hasil pengukuran

Sampel dianalisis secara kualitatif menggunakan metode uji warna untuk membuktikan bahwa ekstrak yang diperoleh mengandung flavonoid kemudian dianalisis secara kuantitatif menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis untuk menentukan kadar flavonoid total dari ketiga metode ekstraksi maserasi, digesti dan refluks.

Secara kuantitatif, data deret konsentrasi yang dibuat dari baku kuersetin dan rutin untuk flavonoid total kemudian dibuat persamaan kurva baku. Persamaan kurva baku $y = bx + a$ dengan $y =$ absorbansi dalam nm, $x =$ kadar dalam ppm (mg/L). Absorbansi ekstrak etanol Buah parijoto (*Medinilla speciosa*) yang telah diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan kurva baku sehingga didapatkan kadar flavonoid total dan fenolik total Buah parijoto (*Medinilla speciosa*).

2. Uji Statistika

Hasil yang diperoleh dianalisis dengan One Way ANOVA dengan program SPSS versi 11. dimulai dengan uji Normalitas, Dilanjutkan dengan uji homogenitas, kemudian setelah data normal dan homogen, Masuk ke tahap uji *oneway anova* untuk mengetahui apakah ada perbedaan kandungan flavonoid total dari ketiga metode ekstraksi tersebut yaitu Maserasi, Digesti dan Refluks.