

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium. Metode penelitian ini membandingkan ekstrak buah parijoto dengan variasi pelarut etanol, untuk mengetahui pelarut mana yang lebih efektif digunakan. Pelarut yang digunakan yaitu konsentrasi 70 % dan 96% . Filtrat buah parijoto kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator*, kemudian dilihat aktivitasnya sebagai antioksidan dengan menggunakan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), berdasarkan aktivitas IC50.

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

a. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni - Agustus 2021.

b. Lokasi penelitian

Determinasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Universitas Diponegoro.

1. Pembuatan ekstrak etanol buah Parijoto dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
2. Laboratorium Kimia Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo, untuk uji aktivitas antioksidan ekstrak buah parijoto.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah buah parijoto yang diambil di Kecamatan Bandungan, Kabupaten Semarang , Jawa Tengah sedangkan sampel dari penelitian ini adalah ekstrak buah parijoto dengan variasi pelarut etanol 70 % dan 96 %.

D. Definisi Operasional

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi pelarut etanol 70% dan 96%

b. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah aktivitas antioksidan ekstrak buah parijoto dengan menggunakan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) dilihat dari nilai IC_{50} .

c. Variable Terkontrol

Variabel terkontrol adalah suhu inkubasi, pH dapar fosfat dan Panjang gelombang pengukuran spektrofotometer ada uji antioksidan.

E. Bahan dan alat Penelitian

a. Bahan Penelitian

1) Bahan Simplisia

Bahan uji yang digunakan adalah dan ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa B.*) yang sebelumnya telah dideterminasi di

2) Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

a) Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain asam oksalat 1%, asam trikloroasetat (TCA), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck[®]), dapar fosfat, Kalium Ferrisianida, Vitamin C (Emsure[®]), Etanol 96% p.a (Brataco[®]), Etanol 96%, Aquades (CV. Bratachem[®]), Asam asetat glasial, .

b) Alat Penelitian

- 1) Alat untuk pembuatan ekstrak etanol buah parijoto meliputi satu set alat maserasi, penyaring, *rotary evaporator* (RE 100-Pro), *waterbath* (Memmert), oven (Binder),
- 2) Alat sentrifugasi, timbangan analitik (Fujitsu[®]).
- 3) Alat untuk analisa IC50 meliputi spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV Mini 1240),
- 4) Alat untuk menguji antioksidan adalah batang pengaduk, labu tentukur (Pyrex[®]), mikro pipet (*nesco*), (Pyrex[®]), oven (J. P. Selecta), Ph-meter.

F. Prosedur Penelitian

a. Determinasi Tumbuhan

Sampel tanaman buah parijoto diperoleh dari Kecamatan Bandungan,

Kabupaten Semarang, Jawa Tengah. Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* B.) dideterminasi di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

b. Penyiapan Bahan

Buah Parijoto yang diperoleh selanjutnya dilakukan sortasi basah untuk memisahkan buah dari dan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing sehingga mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji. Buah Parijoto yang sudah disortasi basah selanjutnya dicuci dengan air mengalir, kemudian ditiriskan hingga tidak ada sisa air. Buah Parijoto kemudian dikeringkan dengan ditutup kain hitam. Buah Parijoto yang sudah kering kemudian disortasi kering, dan digiling menjadi serbuk halus kemudian dilakukan ekstraksi.

c. Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Parijoto (*Medinilla speciose* Reinw. ex Blume)

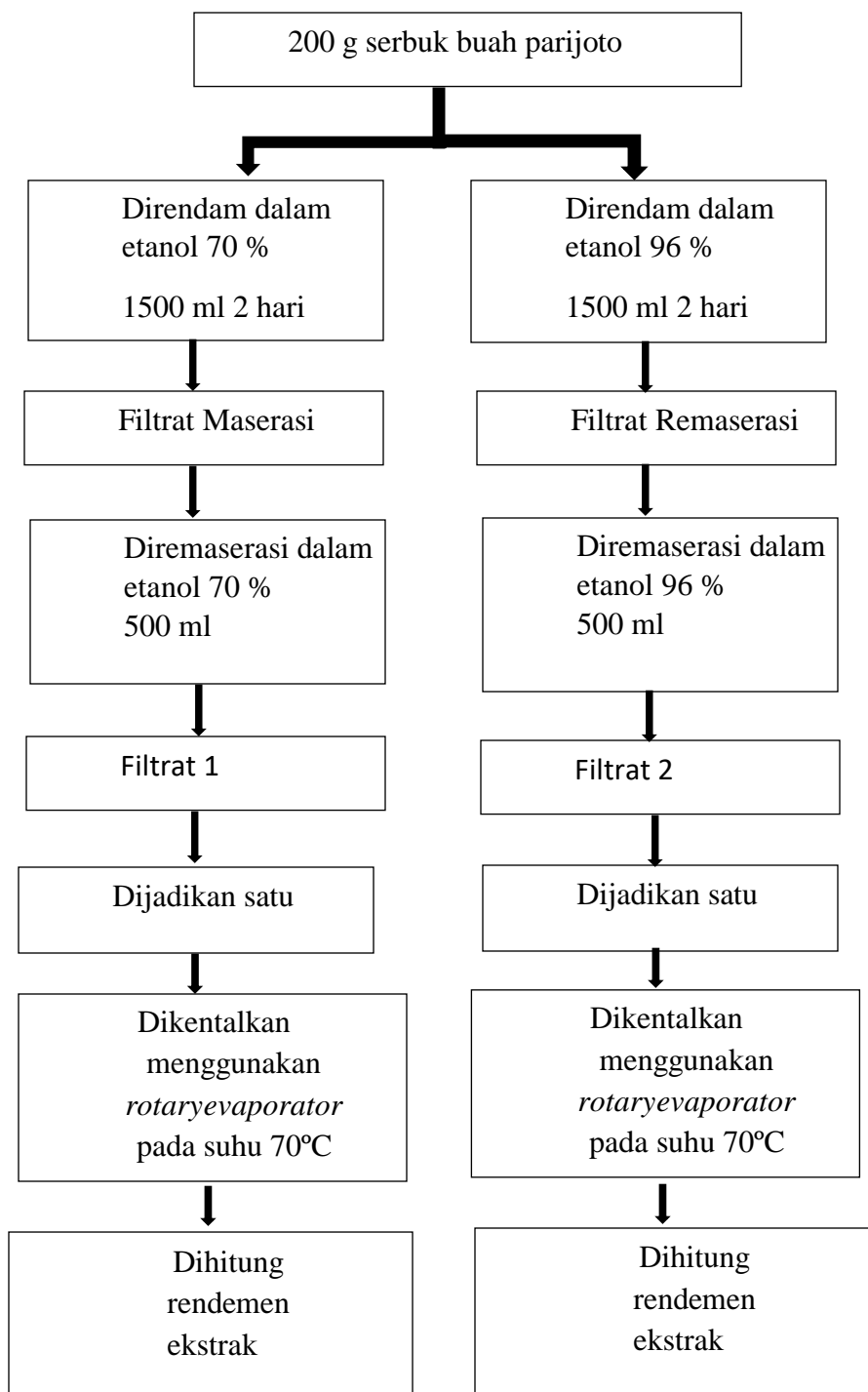
Buah Parijoto diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, dan 96%. Sebanyak 200 g serbuk simplisia buah Parijoto dimaserasi dengan pelarut etanol 96% (1:10) sebanyak 2 L (Advistasari dan Vifta, 2018). Maserasi dilakukan dengan pelarut etanol 1,5 L di dalam wadah terhindar dari cahaya selama 2 hari sambil sesekali diaduk. Kemudian maserat yang diperoleh disaring dilakukan proses remaserasi dengan sisa pelarut etanol sebanyak 500 ml hingga warna pelarut etanol bening yang menandakan pelarut tersebut sudah tidak bias menarik senyawa yang

terdapat dalam simplisia.

Maserat yang diperoleh dipisahkan menggunakan kertas saring dan dilakukan proses remaserasi dengan pelarut yang sama hingga hasil maserat berwarna bening yang menandakan pelarut yang digunakan sudah tidak bisa menarik senyawa yang terdapat dalam simplisia. Hasil maserat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 70° C hingga diperoleh ekstrak etanol buah Parijoto (Vifta dan Advistasari, 2018). Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang untuk menghitung rendemen dan simplisia di tempat yang terlindung dari cahaya atau botol berwarna gelap sampai saat digunakan untuk pengujian (Arunachalam, *et al.*, 2009). Rendemen ekstrak dihitung

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak pekat (g)}}{\text{bobot bahan sampel (g)}} \times 100\%$$

dengan rumus:



Gambar 3.1 Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Parijoto

d. Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis

Untuk mengidentifikasi adanya senyawa flavonoid dalam fraksi buah parijoto juga dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi. Kromatografi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kromatografi lapis tipis. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254 dengan fase gerak n-butanol : asam asetat : akuades (3 : 1 : 1). Selanjutnya dilakukan pendeteksian bercak dengan uap ammonia pekat. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna kuning cokelat setelah diuapi ammonia pada pengamatan dengan sinar tampak pada UV 366 nm dan 254 nm menegaskan adanya kandungan flavonoid (Harborne, 1987).

e. Penyiapan Reagen Penelitian

1) Pembuatan Air Bebas CO₂

Diambil aquades 1000 ml didihkan selama 5 menit (terhitung dimulai saat air mendidih), kemudian ditutup dengan aluminium foil, dicegah hubungan dengan udara semaksimal mungkin. Kemudian, didinginkan tanpa membuka penutup dan segera digunakan (Depkes, 2014; Rahmawanty *et al*, 2015).

2) Larutan Dapar Fosfat 0,2 N pH 6,6

Pertama, Ditimbang 8 gram NaCl, 0,2 gram KCl, 1,44 gram Na₂HPO₄, 0,24 gram KH₂PO₄ dan semua bahan dilarutkan dengan 800 ml air bebas CO₂. Kemudian ,tambahkan HCl tetes demi tetes sampai

terbentuk pH 6,6 dan tambahkan sampai 1000 ml (Vijayalakshmi and Ruckmani, 2016)

3) Larutan Kalium Ferrisianida 1%

Ditimbang 1 gram Kalium Ferrisianida dan dilarutkan dengan aquades, dicukupkan hingga 100 ml dalam labu takar.

4) Larutan FeCl_3 0,1%

Ditimbang 0,1 gram FeCl_3 dan dilarutkan dengan aquades, dicukupkan hingga 100 ml dalam labu takar. Larutan harus selalu dibuat baru.

5) Larutan asam trikloroasetat (TCA) 10%

Ditimbang 10 gram TCA dan dilarutkan dengan aquades, dicukupkan hingga 100 ml dalam labu takar.

6) Pembuatan Larutan Asam Oksalat 1 %

Larutan disiapkan dengan melarutkan 1 gram asam oksalat dalam air bebas CO_2 dan diencerkan dalam labu takar 100 ml.

e. Pembuatan Larutan Standar Asam Askorbat

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 50 mg asam askorbat yang dilarutkan dengan asam oksalat 1% hingga batas labu takar 50 ml. selanjutnya dari larutan 1000 ppm diambil masing-masing 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; dan 0,05 ml lalu ditempatkan pada labu takar 10 ml yang berbeda dan diencerkan dengan asam oksalat 1% hingga 10 ml dan dihomogenkan.

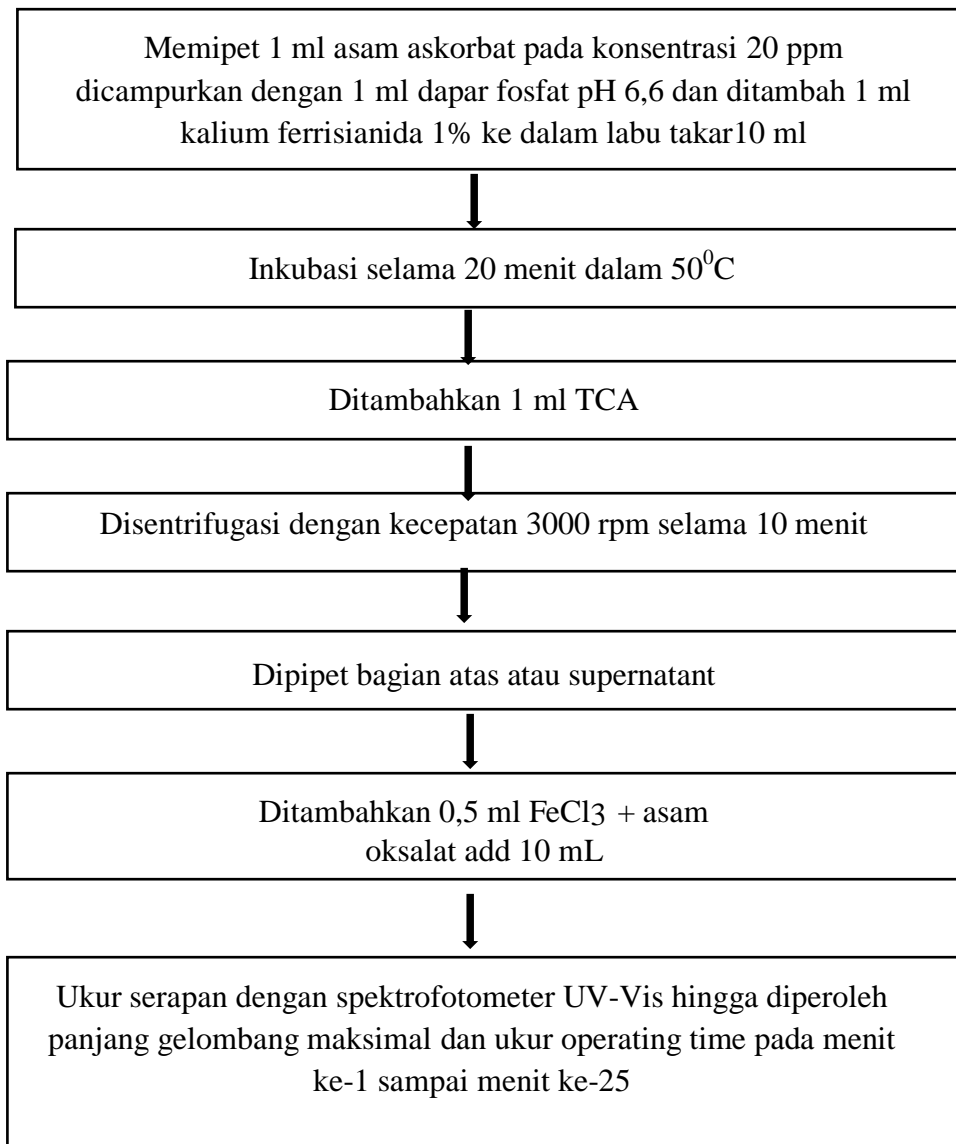
Konsentrasi larutan standar 1000 ppm asam askorbat yakni 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm.

f. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.

Panjang gelombang maksimum diperoleh melalui pengukuran absorbansi dari larutan standar asam askorbat pada konsentrasi 20 ppm dari larutan tersebut diambil 1 ml kemudian dicampurkan dengan 1 ml dapar fosfat 0,2 M (Ph 6,6) dan 1 ml dapar Kalium Ferrisianida 1%, campuran diinkubasi pada 50°C selama 20 menit. Setelah selesai diinkubasi ditambahkan 1 ml larutan asam trikloroasetat, selanjutnya disentrifugasi dan diambil 1 ml supernatan ditambahkan dengan 0,5 ml FeCl₃ 0,1% lalu cukupkan dengan asam oksalat pada labu takar 10 ml. pengujian panjang gelombang diukur nilai absorbansinya pada setiap panjang gelombang dalam kisaran 400-800 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV- Vis.

g. *Operating Time* Mereduksi Kalium Ferrisianida

Hasil dari panjang gelombang maksimal dilanjutkan dengan pengujian *Operating Time* untuk menentukan waktu pertama reaksi paling stabil dan dibaca absorbansinya pada menit ke-1 sampai menit ke 25.

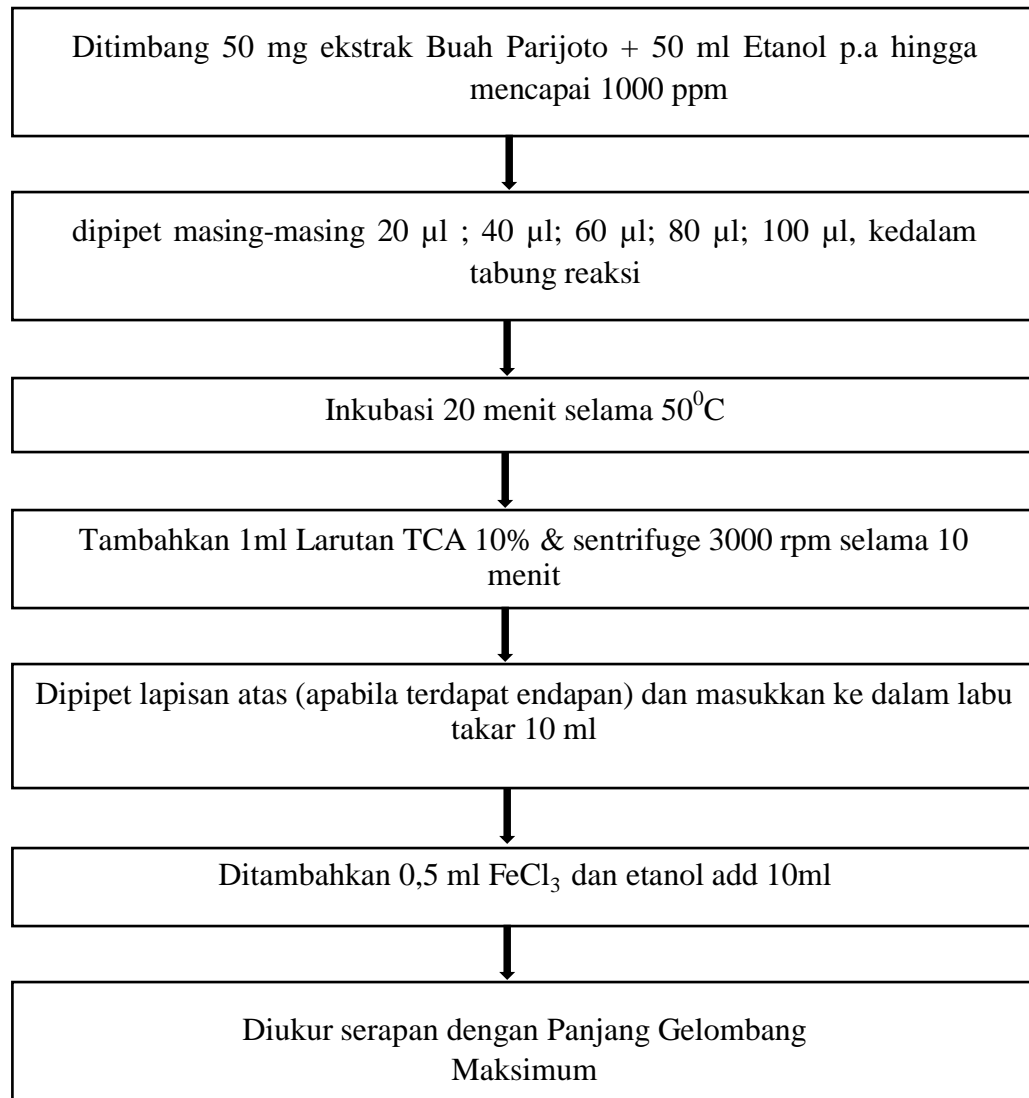


Gambar 3.2 Skema Penentuan Panjang Gelombang Maksimal dan OT

h. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Parijoto

Ditimbang 50 mg ekstrak Buah Parijoto dan dilarutkan dalam 50 ml etanol p.a pada labu takar 50 ml hingga mencapai batas sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dipipet masing-masing 100µl; 200µl;

300µl; 400µl, 500µl ad 10ml, dari larutan stok ke dalam labu ukur hingga diperoleh konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm selanjutnya ditambahkan masing-masing 1 ml dapar fosfat 0,2 N (pH 6,6) dan 1 ml $K_3Fe(CN)_6$ 1%. Selanjutnya inkubasi selama 20 menit dengan suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 ml larutan TCA 10% lalu disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifuge, pipet bagian atas (apa bila terdapat endapan), masukan kedalam labu takar 10ml, kemudian tambahkan 0,5 ml $FeCl^3$, tambahkan etanol p.a ad 10ml, kemudian diukur dengan Panjang gelombang maksimum. Labu ukur terlebih dahulu dilapisi aluminium foil. (Julisah, 2019)



Gambar 3.3 Skema Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Parijoto

Asam askorbat pada konsentrasi 20 ppm dari larutan tersebut diambil 1 ml kemudian dicampurkan dengan 1 ml dapar fosfat 0,2 M (Ph 6,6) dan 1 ml dapar Kalium Ferrisianida 1%, campuran diinkubasi pada 50°C selama 20 menit. Setelah selesai diinkubasi ditambahkan 1 ml larutan asam trikloroasetat, selanjutnya disentrifugasi dan diambil 1 ml supernatan

ditambahkan dengan 0,5 ml FeCl₃ 0,1% lalu cukupkan dengan asam oksalat pada labu takar 10 ml dan diukur sesuai dengan panjang gelombang maksimal.

G. Analisa Data

Untuk aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *inhibition concentration* 50% atau IC₅₀ yaitu konsentrasi sampel yang dapat mereduksi ion Fe sebanyak 50%. Rumus menghitung % aktivitas mereduksi ion Fe:

$$\text{Persen Mereduksi Fe}^{3+} = 1 - \frac{(\text{Absorbansi Vitamin C}) - (\text{Absorbansi Sampel})}{\text{Absorbansi Vitamin C}} \times 100\%$$

Hasil persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linier (x,y) untuk mendapatkan nilai IC₅₀ dimana x sebagai konsentrasi (µg/ml) dan y sebagai persentase aktivitas (%). IC₅₀ sampel dan pembanding diperoleh dengan rumus $y = Bx + A$. Nilai IC₅₀ didapatkan dari x setelah mengganti y dengan 50 (Wachidah, 2013; Magfira, 2018). Nilai IC₅₀ yang semakin kecil, menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidan dari sampel tersebut (Magfira, 2018). Tingkat kekuatan antioksidan dapat diklasifikasikan sebagai berikut Tabel 3.2.

Tabel 3.1 Tingkatan Kekuatan Antioksidan (Magfira, 2018)

| Aktivitas antioksidan | Nilai Value IC₅₀ (ppm) |
|------------------------------|--|
| Sangat kuat | < 50 |
| Kuat | 50-100 |
| Sedang | 101-250 |
| Lemah | 250-500 |

Analisis data untuk pengukuran aktivitas IC50 vitamin C dibandingkan dengan variasi pelarut etanol 70% dan 96%.

H. Analisis Data Secara Statistik

Analisis data secara statistik menggunakan *paired sample test*. Sebelum melakukan analisis *paired sample test*, maka harus dilakukan uji normalitas data, sehingga bisa mendapatkan nilai yang baik. Analisis statistik dilakukan menggunakan program SPSS.