

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan untuk memperoleh data yaitu metode eksperimental laboratorium. Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) digunakan dalam metode penelitian ini, buah parijoto diekstrak dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dan dibuat nanopartikel terenkapsulasi alginat dengan metode gelasi ionik, yang diberi perlakuan ultrasonik dan kemudian dilakukan karakterisasi nanopartikel meliputi % transmitansi serta ukuran partikel dan distribusi partikel (indeks polidispersitas). Formulasi nanopartikel alginat yang diekstraksi dari buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) secara sonikasi kemudian dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode FRAP.

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

##### 1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2021-Februari 2021.

##### 2. Tempat Penelitian

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

- b. Ekstraksi etanol buah pariijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Pembuatan nano ekstrak etanol buah pariijoto (*Medinilla speciosa* Blume) terenkapsulasi alginat dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- d. Pembuatan nanopartikel ekstrak etanol buah pariijoto (*Medinilla speciosa* Blume) terenkapsulasi alginat dengan teknologi ultrasonikasi dilakukan di Laboratorium Fakultas Teknik Pangan Universitas Katolik Soegijapranata Semarang.
- e. Karakterisasi % transmitan serta ukuran dan distribusi partikel (indeks polidispersitas) dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- f. Uji aktivitas kandungan antioksidan formula optimum nanopartikel ekstrak buah pariijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

### **C. Variabel Penelitian**

#### **1. Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pelarut simplisia, variasi waktu dan besar frekuensi gelombang ultrasonik nano ekstrak buah pariijoto (*Medinilla speciosa* Blume), serta konsentrasi uji aktivitas antioksidan dengan metode FRAP.

## 2. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah jenis buah, metode ekstraksi, metode pembuatan nano ekstrak, konsentrasi larutan Alginat : CaCl<sub>2</sub> (0,05%:0,05%), kondisi percobaan meliputi suhu (70°C) dan kecepatan pengadukan (1500 rpm), serta metode uji aktivitas antioksidan.

## D. Alat dan Bahan Penelitian

### 1. Alat

- a. Alat untuk pembuatan ekstrak meliputi alat maserasi (toples, pengaduk) kertas saring, alat-alat gelas laboratorium, *rotary evaporator* RE 2000-E, *waterbath*, neraca analitik OHAUS.
- b. Alat untuk pembuatan nano ekstrak meliputi *magnetic stirrer* Thermo Scientif Cimarec DHH-8, *magnetic stirrer* Ika C-MAG HS 7, satu set alat sentrifugasi PLC Series, alat-alat gelas laboratorium, neraca analitik OHAUS, *ultrasonic homogenizer* UP100H.
- c. Alat untuk karakterisasi nanopartikel meliputi spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV Mini 1240, *Particle Size Analyzer* Malvern, spektrofotometer (UV-1800 Shimadzu).
- d. Alat untuk uji aktivitas antioksidan meliputi labu ukur 10 mL; 25 mL; 50 mL; 100 mL; labu erlenmeyer 25 mL, mikro pipet, tabung reaksi dan spektrofotometer (UV-1800 Shimadzu).

### 2. Bahan

- a. Bahan Simplisia

Penelitian ini menggunakan simplisia dari buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume). Buah parijoto didapatkan dari Desa Colo, Kecamatan Dawe, Kabupaten Kudus, Jawa Tengah.

b. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain etanol 96%, etanol p.a dari Merck, serbuk Sodium alginat (Merck), kristal  $\text{CaCl}_2$  (Brataco), aquades, aquabidest dari Ikapharmindo Putra Mas, serbuk  $\text{FeCl}_3$  (Merck), kristal  $\text{NaOH}$ , kristal  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , serbuk  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , kristal TCA, kristal Asam Oksalat, serbuk Vitamin C (Merck).

**E. Prosedur Penelitian**

1. Determinasi Tanaman

Buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) diperoleh pada bulan Oktober dari Desa Colo, Kecamatan Dawen, Kabupaten Kudus, Jawa Tengah. Pohon buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) diidentifikasi di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Biologi Universitas Diponegoro, Semarang. Determinasi tanaman bahan uji dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan kebenaran bahan yang digunakan pada penelitian, sehingga meminimalisir kesalahan penggunaan bahan.

2. Pembuatan Simplisia Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume)

Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) sebanyak 3,5 kg diperoleh dari Desa Colo, Kecamatan Dawe, Kabupaten Kudus, Jawa Tengah. Kemudian dilakukan sortasi basah, perajangan, pengeringan,

sortasi kering dan pembuatan serbuk simplisia. Bahan yang sudah ada dilakukan sortasi basah dengan memisahkan buah dari tangkai buah dan membuang bagian yang tidak diperlukan sebelum dilakukan pencucian. Kemudian buah yang sudah disortasi dicuci untuk menghilangkan pengotor yang melekat pada buah dengan air mengalir. Setelah itu, dilakukan perajangan untuk mempermudah proses pengeringan dan penggilingan atau penyerbukan. Pengeringan dilakukan dengan menjemur buah parijoto di bawah sinar matahari (Dharma *et al.*, 2020). Tujuan dari pengeringan yaitu untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama karena dengan adanya pengurangan kadar air dan penghentian reaksi enzimatik sehingga dapat mencegah penurunan mutu atau perusakan simplisia (Prasetyo & Inorah, 2013).

Buah parijoto yang sudah kering kemudian disortasi kering untuk memisahkan bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan atau pengotoran-pengotoran lainnya yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering (D. Pratiwi, 2014). Simplisia kering selanjutnya digiling menggunakan *blender* hingga menjadi serbuk yang halus, penggilingan bertujuan untuk memperkecil luas permukaan sehingga kontak permukaan partikel simplisia dengan penyari semakin besar dan penyarian lebih optimal (Diniatik, 2018).

### 3. Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume)

Pembuatan ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan proses perendaman bahan dengan pelarut yang sesuai dengan senyawa aktif yang akan diambil dengan pemanasan rendah atau tanpa adanya proses pemanasan (Suharto *et al.*, 2016). Metode maserasi dipilih karena prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, metode ekstraksi tidak dipanaskan sehingga bahan alam tidak menjadi terurai (Pratiwi, 2010). Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari tersebut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif kemudian zat aktif akan larut (Indraswari, 2008). Serbuk simplisia buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) sebanyak 450 gram dimaserasi menggunakan etanol 96% (1:10) sebanyak 4.5 L sebagai pelarut. Maserasi dilakukan selama 2 hari dan diaduk 3 kali sehari. Maserat dipisahkan menggunakan kertas saring dan dilakukan proses remaserasi selama 1 hari dan diaduk 3 kali sehari dengan pelarut yang sama. Pengadukan diperlukan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar butir serbuk simplisia, sehingga dengan pengadukan tersebut tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sebesar-besarnya antara larutan di dalam sel dengan larutan di luar sel. Pengadukan pada proses maserasi dapat menjamin keseimbangan konsentrasi bahan yang diekstraksi lebih cepat di dalam cairan penyari (Suhaenah, 2016).

Hasil maserat dikumpulkan kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* (Vifta & Advistasari, 2018). Suhu yang akan digunakan pada *rotary evaporator* untuk mengentalkan maserat adalah 70°C. Suhu yang dipakai sesuai dengan penelitian (Khasanah *et al.*, 2014) di mana pada suhu 70°C senyawa metabolit sekunder berupa antosianin flavonoid masih stabil dan tidak rusak. Ekstrak kental kemudian dihitung hasil rendemennya. Rumus perhitungan rendemen sebagai berikut:

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Bobot total ekstrak}}{\text{Bobot total serbuk}} \times 100 \%$$

#### 4. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder suatu bahan alam. Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan yang dapat memberikan gambaran mengenai kandungan senyawa tertentu dalam bahan alam yang akan diteliti. Skrining fitokimia dapat dilakukan, baik secara kualitatif, semi kuantitatif, maupun kuantitatif sesuai dengan tujuan yang diinginkan. Metode skrining fitokimia secara kualitatif dapat dilakukan melalui reaksi warna dengan menggunakan suatu pereaksi tertentu. Hal penting yang mempengaruhi dalam proses skrining fitokimia adalah pemilihan pelarut dan metode ekstraksi. Pelarut yang tidak sesuai memungkinkan senyawa aktif yang diinginkan tidak dapat tertarik secara baik dan sempurna. (Kristianti, *et al.*, 2008).

a. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan mereaksikan ekstrak dengan HCl dan serbuk Mg. Flavonoid terbukti positif jika hasil yang diperoleh menunjukkan perubahan warna merah atau jingga. Asam klorida dan magnesium akan bereaksi membentuk gelembung-gelembung. Fungsi dari larutan magnesium dan HCl untuk mereduksi inti benzopiron pada struktur flavonoid sehingga akan terbentuk warna jingga atau merah. Hasil pengujian menghasilkan warna merah kecoklatan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa* B.) positif mengandung senyawa flavonoid (Farida *et al.*, 2021).

b. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan menggojok ekstrak dengan air hangat kemudian ditetesi dengan HCl untuk melihat kestabilan busa. Saponin memiliki gugus hidrofil dan hidrofob, gugus hidrofil akan berikatan dengan air dan gugus hidrofob akan bereaksi dengan udara sehingga akan menimbulkan buih. Penambahan HCl berfungsi untuk menambah kepolaran sehingga buih yang dihasilkan dapat stabil dan gugus hidrofil akan berikatan lebih stabil (Wang *et al.*, 2018). Ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dikatakan positif mengandung saponin jika hasil uji saponin pada etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) menunjukkan adanya busa.



c. Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan melarutkan ekstrak menggunakan etil asetat kemudian ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  1% hasil positif akan menunjukkan warna hitam kebiruan (Sticher, 2008). Perubahan warna menjadi hitam kebiruan atau hijau diakibatkan ikatan kovalen antara ion  $\text{Fe}^{3+}$  dengan atom O- dari gugus OH yang melepaskan atom H, yang kemudian menghasilkan warna hijau kehitaman (Tiwari *et al.*, 2017). Endapan hitam kehijauan pada hasil pengujian menyatakan bahwa ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) positif mengandung tanin.

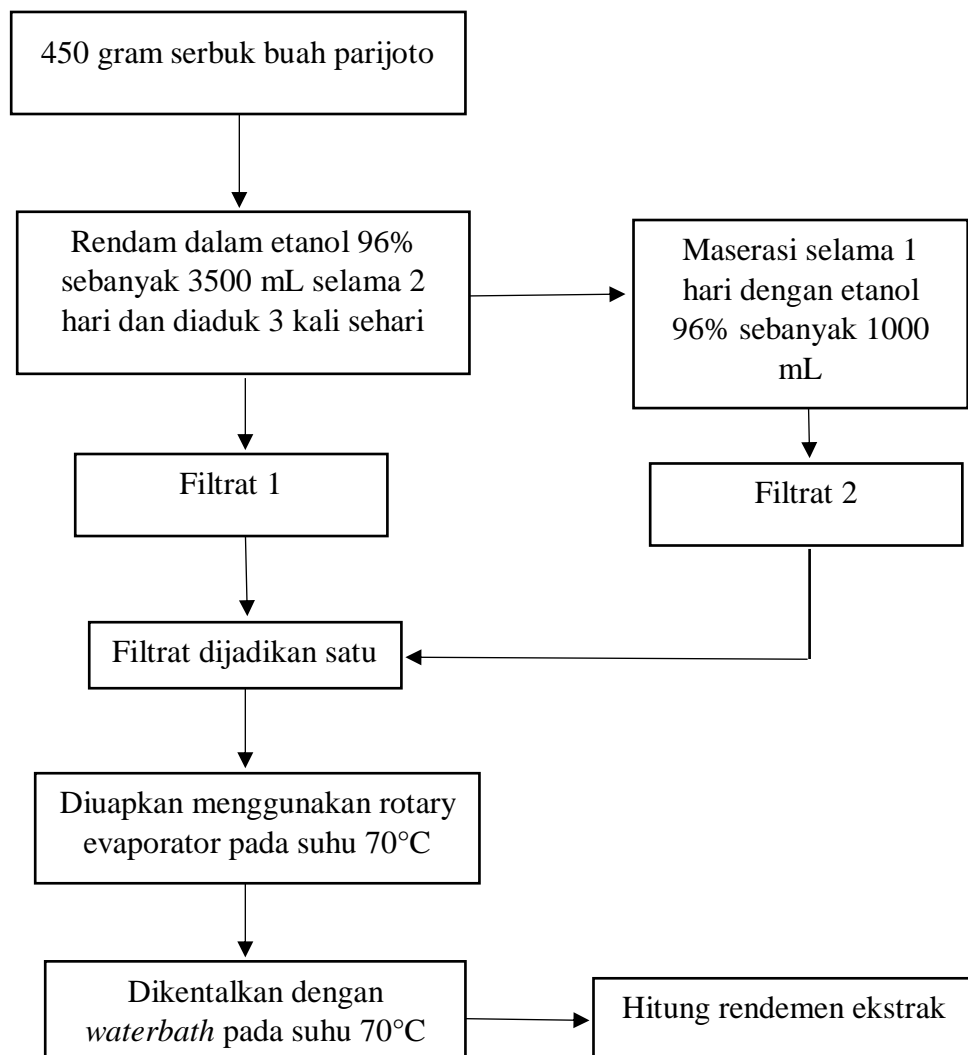
5. Uji Kadar Air

Penetapan kadar air merupakan suatu pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan. Tujuan dari penetapan kadar air, yaitu memberikan batas minimal atau rentang besarnya kandungan air di dalam bahan (Depkes RI, 2000). Penetapan kadar air ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) diukur menggunakan *moisture balance* dan hasilnya dinyatakan dalam bentuk persen. Syarat mutu kadar air yang diperoleh pada simplisia dan ekstrak masing-masing yaitu  $\leq 10\%$ .

6. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol pada ekstrak dilakukan untuk mengetahui bahwa pelarut yang digunakan telah menguap sempurna sehingga tidak mengganggu pengujian lebih lanjut (Kurniawati, 2015). Pengujian

bebas etanol pada ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dilakukan dengan metode oksidasi alkohol parsial, ekstrak ditambah dengan larutan kalium dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) dan diasamkan dengan asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) (Wulandari Rizky, 2017)



**Gambar 3.1. Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Parijoto**

## 7. Pembuatan Nano Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume)

### a. Pembuatan Larutan Alginat

Alginat Sebanyak 0.5 gram dilarutkan dalam 100 mL aquadest, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga larut (Nurhidayati, 2019). Larutan alginat ini menjadi larutan stok 0.5% b/v. Pengenceran dilakukan dengan mengambil sebanyak 10 mL larutan stok 0.5% b/v kemudian ditambahkan aquabidest ad 100 mL hingga didapatkan konsentrasi alginat sebesar 0.05% b/v.

b. Pembuatan Larutan CaCl<sub>2</sub>

CaCl<sub>2</sub> sebanyak 0.05 gram dilarutkan dalam 100 mL aquadest, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga larut (Nurhidayati, 2019). Larutan ini menjadi stok CaCl<sub>2</sub> 0.05% b/v.

c. Pembuatan Nano Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) Terenkapsulasi Alginat.

Nano ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) pada penelitian ini dibuat dengan metode gelasi ionik menggunakan bahan enkapsulan alginat dan *crosslinker* CaCl<sub>2</sub>. Gelasi ionik didasarkan pada kemampuan polielektrolit untuk berikatan silang dengan adanya ion lawan untuk membentuk hidrogel, sodium alginat larut dalam air dan dapat disambungkan silang dengan adanya kation divalen atau polivalen seperti Ca<sup>2+</sup> dan Zn<sup>2+</sup> (Nugroho *et al.*, 2020). Sumber kalsium yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalsium klorida. Kalsium klorida sangat banyak digunakan untuk pembentukan gel alginat. Kelarutan dalam air yang tinggi membuat kecepatan gelasinya tinggi. Metode ini mempunyai

keuntungan berupa preparasi yang sederhana dan ringan tanpa menggunakan pelarut organik yang berbahaya dan tanpa pemanasan yang dapat merusak bahan aktif, sehingga dapat digunakan untuk obat dengan kategori tidak stabil (Nugroho *et al.*, 2020).

Alginat saat ini banyak digunakan dan dikembangkan dalam pembuatan nanopartikel, ion yang diinduksi gelasi alginat banyak dimanfaatkan untuk membuat sistem pembawa dengan bioavailabilitas yang lebih besar dari obat enkapsulasi bentuk sediaan lainnya. Hal ini dikarenakan sifatnya yang tidak beracun, biodegradable dan biokompatibel (Patil *et al.*, 2010). Sodium alginat merupakan jenis alginat yang sering digunakan dalam industri farmasi dan dapat digunakan untuk tujuan memperpanjang pelepasan obat. Metodologi ikatan silang kovalen dapat digunakan untuk membuat nanopartikel berbasis alginat, namun efek samping dapat timbul karena toksisitas yang tinggi dari agen pengikat silang umum (misalnya, glutaraldehid, epiklorohidrin).

Dalam beberapa tahun terakhir, nanopartikel berbasis alginat telah banyak diselidiki sebagai *drug delivery system* untuk pengobatan berbagai penyakit sebagai alternatif rute pemberian sehubungan dengan asupan oral atau injeksi formulasi, penggunaan alginat memberikan beberapa keuntungan seperti proses pembuatannya yang mudah, biokompatibilitas, biodegradabilitas, dan non toksik sehingga dapat diterapkan pada berbagai rute

pemberian obat termasuk sistem penghantaran obat yang ditargetkan (Dodero *et al.*, 2021).

Pengecilan ukuran partikel dapat dibantu melalui proses pengadukan yang salah satunya dilakukan menggunakan alat *magnetic stirrer*. *Magnetic stirrer* pada dasarnya menggunakan prinsip kerja tumbukan antar molekul yang membuat ukuran molekul semakin kecil, kecepatan putaran yang semakin tinggi akan membuat intensitas molekul pelarut semakin besar untuk bersentuhan, sehingga semakin besar intensitas kecepatan putaran pada *magnetic stirrer*, partikel yang dihasilkan semakin kecil. Semakin lama pengadukan ukuran partikel yang dihasilkan akan semakin kecil karena semakin banyak partikel yang terpecah menjadi partikel berukuran nano (Taurina *et al.*, 2017).

Sebanyak 100 mg ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) ditimbang, kemudian dilarutkan dalam etanol p.a sebanyak 35 mL, dicampur dengan 15 mL aquabidest. Ekstrak cair diambil 10 mL kemudian ditambahkan larutan stok alginat konsentrasi 0.05 % b/v sebanyak 50 mL. Selanjutnya di *stirrer* dengan kecepatan 600 rpm selama 30 menit (Ina Handayani, 2020). Kemudian ditambahkan larutan CaCl<sub>2</sub> tetes demi tetes menggunakan pipet sebanyak 12.5 mL dengan konsentrasi 0.05 % b/v disertai dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 600 rpm selama 30 menit, campuran tersebut di *magnetic stirrer* selama

3 jam dengan kecepatan 1500 rpm, dengan perbandingan volume alginat dan CaCl<sub>2</sub> terbaik 4:1 hingga terbentuk koloid nanopartikel. Larutan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 1 jam. Supernatan yang diperoleh berupa koloid nano ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume).

- d. Pemecahan Partikel Nano Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) Menggunakan Teknologi Ultrasonikasi dengan Variasi Waktu Pemaparan Ultrasonikasi dan Variasi Frekuensi Ultrasonikasi

Metode pemecahan partikel yang digunakan pada penelitian ini adalah metode sonikasi, metode sonikasi termasuk dalam jenis *top-down*. Model *top-down* merupakan proses pengurangan ukuran partikel menjadi lebih kecil dengan menggunakan teknik homogenisasi. Proses sonikasi dilakukan dengan menembakan gelombang ultrasonik ke dalam larutan sehingga dapat menghasilkan gelembung kavitasi yang membuat partikel menjadi berdiameter dan berskala nano. Molekul-molekul yang ada pada larutan mengalami regangan dan rapatan saat diberi perlakuan ultrasonikasi. Regangan gelombang memecah ikatan molekul larutan saat energi gelombang ultrasonikasi yang diberikan cukup besar, serta saat ikatan molekul larutan terpecah gas yang terlarut pada pelarut akan kembali timbul menjadi rapatan, dengan itu muncul efek kavitasi atau gelembung berisi gas yang terperangkap

menjadi timbul. Diameter dari gelembung ini dapat membesar menjadi ukuran maksimal, dan dapat berkontraksi sehingga mengecil dan volumenya berkurang (Mason & Lorimer, 2002).

Partikel nano ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) diberi perlakuan menggunakan ultrasonikasi agar partikelnya mengecil dengan variasi waktu pemaparan ultrasonikasi dan variasi frekuensi ultrasonikasi, larutan nano ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) terenkapsulasi alginat kemudian dimasukkan ke dalam perangkat ultrasonikasi. Ultrasonikasi diberi perlakuan dengan variasi waktu 15 menit, 30 menit, 45 menit, 60 menit, dan 75 menit. Serta perlakuan ultrasonikasi dengan variasi frekuensi 45Hz, dan 80Hz. Karakterisasi % transmitan serta ukuran partikel dan distribusi partikel (indeks polidispersitas) dilakukan pada hasil ultrasonikasi. Pemecahan partikel dari nano ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) menggunakan teknologi ultrasonikasi yang divariasikan waktu pemaparan dan frekuensinya. Perlakuan ultrasonikasi dilakukan dengan memasukkan nano ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) terenkapsulasi alginat pada alat ultrasonikasi.

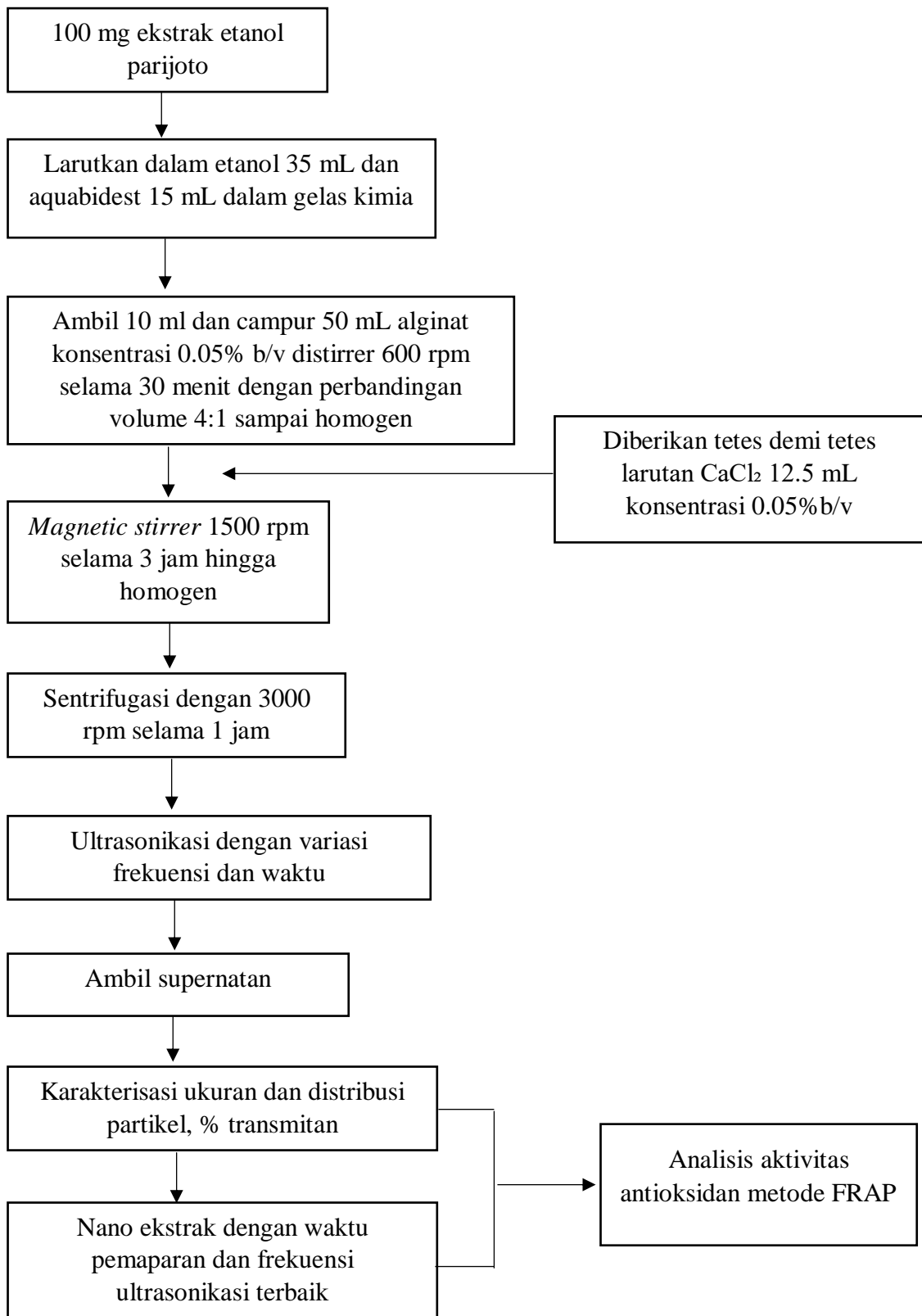
Nanopartikel yang diperoleh dari perlakuan ultrasonikasi merupakan suatu proses homogenisasi yang menjadikan ukuran partikel lebih rata dan larut sehingga partikel yang ada menjadi seragam, prinsip yang digunakan yaitu dengan pemancaran

gelombang ultrasonik yang membuat larutan mengalami agregasi sehingga diperoleh ukuran nano pada partikel (Mason & Lorimer, 2002).

**Tabel 3.1. Variasi Waktu dan Frekuensi Ultrasonikasi Pada Nano Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume)**

Frekuensi Waktu	45Hz	80Hz
15 menit	15';45Hz	15';80Hz
30 menit	30';45Hz	30';80Hz
45 menit	45';45Hz	45';80Hz
60 menit	60';45Hz	60';80Hz
75 menit	75';45Hz	75';80Hz





**Gambar 3.2. Skema Pembuatan Nano Ekstrak Buah Parijoto dengan Variasi Waktu dan Variasi Frekuensi Ultrasonikasi**

## 8. Karakterisasi Nano Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume)

### a. % Transmitan

Nanopartikel ekstrak buah parijoto diambil sebanyak 100  $\mu$ L ditambahkan aquabidest hingga volume akhir 10 mL. Homogenisasi dengan *magnetic stirrer* selama 1 menit. Nanopartikel ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) diukur transmitannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 650 nm (Huda & Wahyuningsih, 2018). Persen transmitan dinyatakan dalam bentuk persentase.

### b. Ukuran dan Distribusi Partikel

Ukuran partikel dan distribusi partikel (indeks polidispersitas) diamati menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) (Choiri *et al.*, 2016) . Rentang indeks polidispersitas berada diantara 0 sampai dengan 1. Ukuran partikel atau indeks polidispersitas seragam jika hasilnya kecil atau mendekati 0, jika angka indeks polidispersitas melebihi 0.5 maka perbedaan ukuran partikel semakin tinggi.

## 9. Uji Aktivitas Antioksidan

### a. Penyiapan Reagen

#### 1) Pembuatan Air Bebas CO<sub>2</sub>

Aquadest sebanyak 600 mL didihkan selama 5 menit (terhitung saat air mendidih), tutup dengan alumunium foil dan

cegah hubungan dengan udara semaksimal mungkin. Kemudian dinginkan tanpa membuka penutup dan segera digunakan.

2) Larutan Dapar Fosfat 0.2 M pH 6,6

NaOH sebanyak 2 gram ditimbang kemudian dilarutkan dengan aquades bebas CO<sub>2</sub> dalam labu takar ad 250 mL. Kemudian sebanyak 6,8 gram KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dilarutkan dengan aquades bebas CO<sub>2</sub> dalam labu takar ad 250 mL. Kemudian dipipet sebanyak 16,4 mL NaOH dimasukkan dalam labu takar dan dicampurkan 50 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, tabahkan HCl tetes demi tetes sampai pH 6,6 diukur menggunakan pH meter dan adkan dengan aquades bebas CO<sub>2</sub> sampai 200 mL.

3) Larutan Kalium Ferrisianida 1%

Kalium ferrisianida (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) sebanyak 1 gram dilarutkan dalam aquades dan diencerkan dalam labu takar 100 mL.

4) Larutan FeCl<sub>3</sub> 0,1%

FeCl<sub>3</sub> sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam aquades dan diencerkan dalam labu takar ad 100 mL.

5) Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10%

TCA sebanyak 10 gram dilarutkan dalam aquades dan diencerkan dalam labu takar 100 mL.

6) Larutan Standar Asam Oksalat 1%

Asam oksalat sebanyak 1 gram dilarutkan dalam air bebas CO<sub>2</sub> dan diencerkan dalam labu takar 100 mL.

7) Larutan Stok Vitamin C 1000 ppm

Asam askorbat sebanyak 25 mg dilarutkan dengan asam oksalat 1% hingga batas labu takar ad 25 mL.

b. Pembuatan Baku Perbandingan

Larutan stok 1000 ppm diambil 0,7 mL dimasukkan dalam labu ukur 10 mL diencerkan dengan asam oksalat 1% hingga 10 mL dan dihomogenkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar 70 ppm.

c. Pembuatan Larutan Blanko

Dapar fosfat 0.2 M (pH 6,6) 1 mL dicampur dengan 1 mL kalium ferrisianida 1%, diinkubasi pada 50°C selama 20 menit. Kemudian ditambah 1 mL TCA 10%, disentrifugasi kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dan diambil 1 mL supernatan ditambah 0,5 mL FeCl<sub>3</sub> 0,1% lalu tambahkan dengan asam oksalat pada labu takar sebanyak 5,5 mL.

d. Pembuatan Larutan Vitamin C

Larutan baku perbandingan konsentrasi 70 ppm diambil 1 mL kemudian ditambah dapar fosfat 0.2 M (pH 6,6) 1 mL dicampur dengan 1 mL kalium ferrisianida 1%, diinkubasi pada 50°C selama 20 menit. Kemudian ditambah 1 mL TCA 10%, disentrifugasi

kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dan diambil 1 mL supernatan ditambah 0,5 mL FeCl<sub>3</sub> 0,1% lalu tambahkan dengan asam oksalat pada labu takar 10 mL sampai tanda batas.

e. Penentuan Panjang Gelombang

Pengujian aktivitas antioksidan didahului dengan penetapan panjang gelombang maksimum dari larutan vitamin C yang digunakan untuk mengukur absorbansi larutan standar dan larutan sampel. Penentuan panjang gelombang dilakukan dengan pengukuran absorbansi larutan vitamin C dengan konsentrasi 70 ppm (Maryam *et al.*, 2016). Pengukuran panjang gelombang dari 400-800 untuk menentukan panjang gelombang maksimum (Magfira, 2018). Larutan blanko dan larutan vitamin C yang diperoleh diukur nilai absorbansinya dan panjang gelombang maksimalnya dengan rentang spektrum 400-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

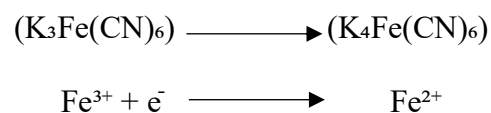
f. Operating Time

Panjang gelombang dan absorbansi yang diperoleh dari pengukuran yang telah dilakukan dilanjutkan untuk pengujian *operating time* pada menit ke 1 sampai 30 untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan suatu senyawa saat bereaksi hingga terbentuk senyawa yang stabil.

g. Uji Aktivitas Antioksidan Nano Ekstrak Buah Parijoto

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) dilakukan pada tiga kelompok sampel, sampel vitamin C, nano ekstrak buah parijoto dan nanopartikel ekstrak buah parijoto. Pada sampel vitamin C konsentrasi yang dipakai adalah 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm. Kelompok nano ekstrak dan nanopartikel ekstrak buah parijoto memakai konsentrasi 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm, 9 ppm, dan 11 ppm. Sampel-sampel yang diuji menghasilkan nilai absorbansi yang digunakan untuk menghitung % mereduksi  $\text{Fe}^{3+}$  sehingga memperoleh regresi linier ( $y = bx + a$ ) untuk menentukan nilai  $\text{IC}_{50}$ .

Uji aktivitas antioksidan dengan metode FRAP diawal dengan mencampurkan 1 mL larutan vitamin c dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm serta 1 mL larutan nano ekstrak enkapsulan alginat dan nanopartikel ekstrak buah Parijoto konsentrasi 1, 3, 5, 7, 9, dan 11 ppm dengan 1 mL dapar fosfat (0.2 M pH 6,6) untuk menstabilkan pH, kemudian 1 mL larutan kalium ferrisianida 1% ditambahkan untuk mereduksi ion  $\text{Fe}^{3+}$  dalam larutan sampel menjadi  $\text{Fe}^{2+}$ . Reaksi yang terjadi sebagai berikut:



**Gambar 3.3 Reaksi Reduksi  $\text{Fe}^{3+}$  menjadi  $\text{Fe}^{2+}$  (Tahir *et al.*, 2016)**

Larutan sampel vitamin C, nano ekstrak dan nanopartikel diinkubasi untuk mempercepat reaksi dengan suhu  $50^\circ\text{C}$  selama 20

menit. Penambahan TCA dilakukan pada setiap sampel setelah diinkubasi dengan tujuan untuk mengendapkan  $(K_3Fe(CN)_6)$  agar dapat dipisahkan dengan larutan sampel. Pemisahan endapan  $(K_3Fe(CN)_6)$  dibantu dengan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Kemudian untuk membentuk kompleks warna biru pada sampel ditambahkan  $FeCl_3$  0,1% sebanyak 0,5 mL pada sampel, ditambahkan asam oksalat sampai tanda batas labu ukur 10 mL pada sampel vitamin C, serta ditambahkan aquadest sampai tanda batas labu ukur 10 mL pada sampel nano ekstrak dan nanopartikel, sehingga sampel dapat terbaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 696,00 nm dengan absorbansi 0,474. Donor elektron dalam mereduksi ferri sianida  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  menjadi ferro sianida  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  sebagai penentu kekuatan daya reduksi sampel dengan pereduksian  $Fe^{3+}$  yang berwarna kuning menjadi kompleks  $Fe^{2+}$  yang berwarna hijau kebiruan, semakin pekat warna biru yang dihasilkan maka nilai persen reduksi semakin tinggi (Maesaroh *et al.*, 2018).

Sebanyak 50 mg ekstrak yang dikonversi ke dalam jumlah sampel uji ditimbang secara seksama, dilarutkan dalam 50 mL etanol pada labu takar 50 mL sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Kemudian larutan dipipet masing-masing 10  $\mu$ l; 30  $\mu$ l; 50  $\mu$ l; 70  $\mu$ l; 90  $\mu$ l dan 110  $\mu$ l, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, diperoleh konsentrasi 1, 3, 5, 7, 9, dan 11 ppm.

Selanjutnya pada larutan masing-masing konsentrasi ditambahkan dapar fosfat 0.2 M (pH 6,6) 1 mL dicampur dengan 1 mL kalium ferrisianida 1%, diinkubasi pada 50°C selama 20 menit. Kemudian ditambah 1 mL TCA 10%, disentrifugasi kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dan diambil 1 mL supernatan ditambah 0,5 mL FeCl<sub>3</sub> 0,1% lalu tambahkan dengan aquadest pada labu takar 10 mL sampai tanda batas. Selanjutnya, larutan masing-masing konsentrasi diukur absorbansinya dengan panjang gelombang maksimumnya pada spektrofotometer UV-Vis.

#### F. Analisis Data

Ukuran partikel dan distribusi partikel (indeks polidispersitas) diamati menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA), nilai persen transmittan dilihat menggunakan spektrofotometri UV-Vis, penentuan kandungan dari nano ekstrak buah parijoto untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada formula optimal menggunakan metode FRAP dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* (IC<sub>50</sub>) yaitu sebanyak 50% dari konsentrasi sampel dapat mereduksi ion Fe. Rumus hitung % aktivitas mereduksi ion Fe:

$$\% \text{ mereduksi Fe}^{3+} = 1 - \frac{(\text{absorbansi blangko} - \text{absorbansi sampel})}{\text{absorbansi blangko}} \times 100\%$$

Hasil persentase yang diperoleh pada masing-masing konsentrasi kemudian dihitung nilai IC<sub>50</sub> dengan persamaan regresi linier (x, y), di mana x adalah konsentrasi dan y sebagai persen aktivitas mereduksi. Rumus untuk memperoleh IC<sub>50</sub> yaitu  $y = bx + a$ , y pada persamaan diganti dengan 50 untuk



memeroleh nilai  $IC_{50}$  (Tusanti *et al.*, 2014). Semakin kecil nilai  $IC_{50}$ , maka semakin tinggi aktivitas antioksidan pada sampel (Nurhasnawati *et al.*, 2017). Tingkat kekuatan antioksidan pada tabel 3.2.

**Tabel 3.2 Tingkatan Kekuatan Antioksidan (Magfira, 2018)**

Aktivitas Antioksidan	Nilai $IC_{50}$ (ppm)
Sangat kuat	< 50
Kuat	50-100
Sedang	100-250
Lemah	250-500

Analisa data uji aktivitas antioksidan diperoleh menggunakan analisis variansi (Anova) dengan kepercayaan 95% menggunakan program SPSS. Hasil dan data dianalisis secara kuantitatif serta disajikan dalam bentuk gambar dan tabel.