

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Desain penelitian yang dilakukan adalah eksperimental dengan analisis deskriptif. Buah dan tangkai buah parijoto yang telah menjadi serbuk kemudian di ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Hasil rendemen kemudian dihitung rendemen dan kadar air, kandungan senyawa flavonoid total dan aktivitas antioksidan pada masing-masing bagian tanaman.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### 1. Lokasi penelitian

- a. Penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Instrumen Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
- b. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas Sains dan Matematika Univeristas Diponegoro Semarang.

##### 2. Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Desember 2021 – Februari 2022

#### **C. Subjek Penelitian**

Subjek dalam penelitian ini adalah buah dan tangkai buah tanaman parijoto (*Medinilla speciosa* B.) yang diperoleh dari Kudus, Jawa Tengah.

#### **D. Definisi Operasional**

Definisi operasional yang digunakan untuk mengetahui kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan bagian tanaman parijoto (*Medinilla speciosa* B.) pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

##### **1. Parijoto (*Medinilla speciosa* B.)**

Parijoto merupakan tumbuhan yang diperoleh dari Desa Colo, Kecamatan Dawe, Kabupaten Kudus, Jawa Tengah. Tumbuhan Parijoto sendiri mengandung beberapa zat yang pemanfaatannya sering digunakan dalam obat tradisional dan pada penelitian ini senyawa yang dianalisis yaitu kandungan flavonoid pada ekstrak buah dan tangkai buah Parijoto.

##### **2. Ekstrak buah**

Ekstrak buah merupakan ekstrak yang diperoleh dari simplisia buah parijoto menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 96%.

##### **3. Ekstrak tangkai buah**

Ekstrak tangkai buah parijoto merupakan ekstrak yang diperoleh dari simplisia tangkai buah parijoto menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 96%.

##### **4. Flavonoid**

Flavonoid merupakan salah satu jenis senyawa yang sering ditemukan pada tumbuhan termasuk pada buah dan tangkai buah Parijoto (*Medinilla speciosa* B.). Senyawa flavonoid merupakan salah satu senyawa yang berperan sebagai antioksidan dengan menghambat radikal bebas.

## **5. Antioksidan**

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat radikal bebas. Aktivitas antioksidan ekstrak buah dan tangkai buah (*Medinilla speciosa* B.) didasarkan pada nilai IC<sub>50</sub>.

## **6. Spektrofotometri UV-Vis**

Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode yang digunakan pada penelitian ini dalam mengukur kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak buah dan tangkai buah Parijoto (*Medinilla speciosa* B.).

## **7. DPPH**

DPPH merupakan metode yang digunakan pada penelitian ini dalam penentuan aktivitas antioksidan ekstrak buah dan tangkai buah Parijoto (*Medinilla speciosa* B.).

## **E. Variabel Penelitian**

### **1. Variabel bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bagian tanaman buah dan tangkai buah Parijoto (*Medinilla speciosa* B.) serta konsentrasi ekstrak dalam penetapan kadar flavonoid total pada konsentrasi 1000 ppm dan aktivitas antioksidan pada konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm.

### **2. Variabel terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dari ekstrak buah dan tangkai buah Parijoto (*Medinilla speciosa* B.).

### 3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu suhu pada setiap perlakuan, waktu ekstraksi, volume pelarut dalam proses ekstraksi, dan tempat tumbuh Parijoto (*Medinilla speciosa* B.).

## F. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *bekerglass* (Pyrex), Erlenmeyer (Pyrex), blender (Phillips), neraca digital, kertas saring, ayakan 40 mesh, Spektrofotometer Uv-Vis (Shimadzu UV-1800), Rotary Evaporator RE-2000E, labu ukur, *waterbath*, cawan penguap, aluminium foil, *moisture analyzer*.

### 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah dan tangkai buah Parijoto yang diambil dari Desa Colo Kabupaten Kudus, etanol 96% (Deklinol), NaOH, HCl, serbuk Mg, kuersetin, larutan AlCl<sub>3</sub> 10%, asam asetat glacial 5%, etanol (p.a), DPPH.

## G. Pengumpulan Data

### 1. Determinasi tanaman

Tanaman pariijoto (*Medinilla speciosa* B.) didapatkan pada bulan Oktober 2021 di Kudus, Jawa Tengah. Sampel tanaman kemudian dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

## 2. Pembuatan Simplisia

Buah dan tangkai buah Parijoto 5 kg yang masih segar dipisahkan antara buah dan tangkai buahnya, kemudian dilakukan sortasi basah untuk menghilangkan pengotor/ bagian lain yang tidak diperlukan. Kemudian dilakukan pencucian dibawah air mengalir dan dikeringkan dibawah sinar matahari tidak langsung dengan menutupi menggunakan kain hitam. Setelah kering kemudian dilakukan sortasi kering untuk memisahkan bagian yang tidak diperlukan. Buah dan tangkai buah Parijoto yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender sehingga menjadi serbuk halus dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh dan disimpan dalam wadah yang tertutup rapat (Rivai *et al.*, 2014).

## 3. Pembuatan ekstrak

### a. Ekstrak buah

Serbuk buah yang sudah diayak kemudian ditimbang sebanyak 300 gram dan dimaserasi dalam wadah kaca dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1.500 mL hingga seluruh serbuk terendam. Serbuk simplisia yang sudah direndam kemudian diaduk secara berkala lalu didiamkan selama  $3 \times 24$  jam pada suhu ruang dan gelap yang terlindung dari cahaya langsung. Kemudian disaring menggunakan kertas saring dan dilakukan proses remaserasi atau penambahan ulang pelarut sebanyak 300 mL etanol 96% selama 1 hari. Setelah dilakukan proses remaserasi dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring dan dipekatkan menggunakan *rotary*

*evaporator* dengan suhu 50-55°C hingga etanol berkurang. Kemudian ekstrak diuapkan diatas *waterbath* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental (Matheos et al., 2014).

b. Ekstrak tangkai buah

Serbuk tangkai buah Parijoto yang telah diayak, ditimbang sebanyak 150 gram kemudian dimaserasi dengan perbandingan 1 : 5 menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 750 mL. Serbuk simplisia yang dimaserasi kemudian diaduk secara berkala dan didiamkan selama  $3 \times 24$  jam pada suhu ruang dan gelap yang terlindung dari cahaya langsung. Kemudian disaring menggunakan kertas saring dan dilakukan proses remaserasi atau penambahan ulang pelarut sebanyak 200 mL etanol 96% selama 1 hari. Setelah dilakukan proses remaserasi dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring dan kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 50-55°C hingga etanol berkurang. Kemudian ekstrak diuapkan diatas *waterbath* pada suhu yang sama pada saat menguapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (Rivai et al., 2014).

Hasil rendemen ekstrak buah dan tangkai buah Parijoto dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{bobot simplisia sebelum diekstraksi (g)}} \times 100\%$$

#### **4. Uji kadar air**

##### a. Uji kadar air simplisia

Dimasukkan serbuk simplisia yang telah dihaluskan kedalam alat *moisture analyzer* kurang lebih 3 gram. Proses ini membutuhkan waktu 15 menit (Utami *et al.*, 2017).

##### b. Uji kadar air ekstrak

Dimasukkan ekstrak buah dan tangkai buah Parijoto (*Medinilla speciosa* B.) ke dalam alat *moisture analyzer* kurang lebih 3 gram. Proses ini membutuhkan waktu 15 menit (Utami *et al.*, 2017).

#### **5. Analisis kualitatif Flavonoid**

Identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder flavonoid dilakukan dengan cara mengambil sejumlah tertentu ekstrak kemudian ditambahkan beberapa tetes HCl pekat dan sedikit serbuk Mg. Pembentukan warna kuning, orange, dan merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Pujiastuti & Islamiyati, 2021).

#### **6. Uji kuantitatif flavonoid total**

##### a. Pembuatan larutan induk kuersetin

Dibuat larutan standar 1000 ppm dengan cara menimbang 25 mg kuersetin dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga volume akhir 25 mL. dari larutan stok tersebut dipipet sebanyak 1 mL dan diencerkan dengan etanol p.a hingga volume 10 mL sehingga dihasilkan konsentrasi 100 ppm (Mukhriani *et al.*, 2019).

b. Pembuatan larutan baku kuersetin

Larutan baku kuersetin dibuat dari larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm. Dari larutan induk kuersetin diambil 4, 5, 6, 7, dan 8 mL. Sehingga diperoleh seri konsentrasi 40, 50, 60, 70, dan 80 mL (Mukhriani *et al.*, 2019).

c. Penentuan *Operating Time* (OT)

Larutan baku kuersetin 50 ppm diambil sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5%. Selanjutnya, larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum teoritis 415 nm selama 1 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil. Diamati kurva hubungan absorbansi, waktu, dan ditentukan *operating time* (Asmorowati & Lindawati, 2019).

d. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum ( $\lambda$  maks)

Larutan baku kuersetin 50 ppm diambil sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5%. Lakukan pembacaan dengan spektrofotometri Uv-Vis pada panjang gelombang 370-450 nm. Hasil panjang gelombang maksimum tersebut digunakan untuk mengukur serapan dari sampel ekstrak parijoto (*Medinilla speciosa* B.) (Asmorowati & Lindawati, 2019).

e. Penentuan larutan kurva baku kuersetin

Larutan baku kuersetin dengan seri konsentrasi 40, 50, 60, 70, dan 80 mL diambil sebanyak 1 mL tiap konsentrasi. Ditambahkan 1

mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5% dan didiamkan selama 30 menit. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah diperoleh (Asmorowati & Lindawati, 2019).

f. Penentuan kandungan flavonoid total

Diambil sampel sebanyak 10 mg dalam etanol 10 mL hingga diperoleh 1000 ppm. Diambil larutan sampel sebanyak 1 mL dan ditambahkan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5%. Campuran dinkubasi selama *operating time* pada suhu kamar dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah diperoleh. Percobaan dilakukan tiga kali ulangan (Mukhriani *et al.*, 2019). Penentuan nilai flavonoid total dilakukan berdasarkan formula (Mukhriani *et al.*, 2019) yaitu :

$$\text{Flavonoid total} = \frac{c.v.fp}{g}$$

Keterangan :

c = konsentrasi sampel

v = volume ekstrak yang digunakan

fp = faktor pengenceran

g = berat sampel

## 7. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan larutan DPPH 0,4mM

Ditimbang sebanyak 0,0039 gram DPPH yang kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,4mM (Sami & Rahimah, 2015).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH ( $\lambda$  maks)

Dipipet larutan stok DPPH 0,4 mM sebanyak 1 ml dalam etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 5 ml. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm untuk mendapatkan panjang gelombang maksimum DPPH (Bakti *et al.*, 2017).

c. Penentuan *Operating Time* (OT)

Dipipet larutan stok DPPH 0,4 mM sebanyak 1 ml dalam etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 5 ml. Larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dengan interval waktu 0-90 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Bakti *et al.*, 2017).

d. Pengukuran DPPH sebagai kontrol

Dipipet larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 ml dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 5 ml. Kemudian diinkubasi selama waktu *operating time* yang telah diperoleh dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diketahui (Bakti *et al.*, 2017).

e. Pengukuran pembanding kuersetin

Dibuat larutan baku kuersetin dengan menimbang 2,5 mg dilarutkan dalam labu ukur 25 ml dengan etanol p.a sampai tanda batas, sehingga didapatkan konsentrasi 100 ppm. Dari larutan baku kuersetin 100 ppm, dipipet 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 ml ditambahkan

etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 10 ml sehingga didapatkan seri konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm (Bakti *et al.*, 2017).

Diambil masing-masing larutan seri kuersetin sebanyak 1 ml, ditambahkan sebanyak 1 ml larutan standar DPPH 0,4 mM kemudian ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas pada labu 5 ml. Kemudian didiamkan ditempat gelap selama *operating time* yang ditentukan dan dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Bakti *et al.*, 2017).

f. Pengukuran aktivitas antioksidan

Ditimbang masing-masing ekstrak sebanyak 1 mg dalam etanol p.a pada labu 10 ml hingga tanda batas hingga diperoleh larutan stok 100 ppm. Dari larutan stok 100 ppm dipipet 1, 2, 3, 4, dan 5 ml ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas pada labu 10 ml sehingga didapatkan seri konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm (Bakti *et al.*, 2017).

Diambil masing-masing larutan seri konsentrasi sebanyak 1 ml, ditambahkan 1 ml larutan stok DPPH 0,4mM dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas pada labu 5 ml. Larutan didiamkan ditempat gelap selama *operating time* kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Bakti *et al.*, 2017).

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol buah dan tangkai buah Parijoto yang diperoleh kemudian dihitung besarnya hambatan serapan radikal bebas DPPH dengan cara menghitung persentase inhibisi

serapan DPPH (Bakti *et al.*, 2017). Rumus persentase inhibisi serapan

DPPH :

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100 \%$$

g. Nilai IC<sub>50</sub>

Nilai IC diperoleh persamaan regresi linier (x adalah konsentrasi sampel dan y adalah persen inhibisi). Persamaan tersebut adalah  $y = bx + a$  (Pujiastuti & Saputri, 2019).

## H. Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam menentukan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak Parijoto (*Medinilla speciosa* B.) yaitu menggunakan persamaan  $y = bx + a$ , dimana y = absorbansi (nm), x = kadar (ppm) yang diperoleh dari hasil kurva baku pembanding flavonoid dan aktivitas antioksidan. Hasil dari persamaan tersebut kemudian dianalisa secara statistik menggunakan SPSS dan disajikan dalam bentuk tabel maupun lainnya (Magfira, 2018).