

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode eksperimental laboratorium ekstrak parijoto (*Medinilla speciosa* B.) dibuat dengan variasi pelarut etanol 96%, air, dan etil asetat kemudian dilakukan uji skrining dan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis.

#### **B. Lokasi Penelitian**

##### 1. Determinasi tanaman

Determinasi bahan dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

##### 2. Pembuatan ekstrak

Simplisia yang sudah disiapkan diekstrak di Laboratorium Fitokimia Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

##### 3. Pengujian ekstrak

Lokasi penelitian dan pengujian ekstrak dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Instrumen Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

### **C. Subjek Penelitian**

#### 1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan ekstrak parijoto (*Medinilla speciosa* B.) asal Bandungan

#### 2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak parijoto (*Medinilla speciosa* B.) menggunakan dengan variasi pelarut etanol 96%, air, dan etil asetat.

### **D. Definisi Operasional**

#### 1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah faktor yang mempengaruhi hasil atau penyebab utama perbedaan, variabel bebas dalam penelitian ini yaitu variasi pelarut dengan pelarut etanol 96%, air, dan etil asetat pada ekstrak parijoto (*Medinilla speciosa* B.).

#### 2. Variabel terikat

Variabel terikat yaitu variabel yang dapat diukur untuk menentukan ada atau tidak pengaruh dari variabel bebas seperti kandungan dalam ekstrak parijoto dengan mengukur IC<sub>50</sub>

#### 3. Variabel Kontrol

Variabel terkendali merupakan variabel faktor yang bisa mempengaruhi hasil penelitian, seperti suhu, bahan, dan kondisi diruangan laboratorium tetapi dapat dikendalikan oleh peneliti.

## E. Pengumpulan Data

### 1. Pengumpulan Bahan

Tanaman yang digunakan dalam percobaan ini adalah parijoto (*Medinilla speciosa* B.). Terutama buah yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Bandungan

### 2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium untuk mengetahui kebenaran parijoto (*Medinilla speciosa* B.) yang akan digunakan pada penelitian ini untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan utama penelitian dan mencegah kemungkinan tercampur dengan tanaman atau simplisia lainnya.

### 3. Penyiapan Alat dan Bahan

#### a. Alat

Seperangkat alat maserasi, blender Philip, batang pengaduk, beker gelas pyrex, penangas air Memmert, *evapor rotary*, spektrofotometer (Uv-Vis) Shimadzu, ayakan 50 mesh Retch, *rotary evaporator* RE Pro, timbangan analitik Ohaus, pipet tetes, labu ukur Iwaki, tabung reaksi pyrex.

#### b. Bahan

Aquades Emsure, etanol 96% Emsure, etil asetat Emprove sebagai pelarut, HCl 2 M, FeCl<sub>3</sub> 1% Merck, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, AlCl<sub>3</sub> 10%

Merck sebagai bahan skrining, serbuk DPPH Sigma, Kuercetin Sigma sebagai bahan penguji antioksidan.

## **F. Prosedur Penelitian**

### **1. Determinasi Tanaman Parijoto**

Tanaman parijoto (*Medinilla speciosa* B.) yang berasal dari Bandungan dilakukan determinasi di laboratorium Ekologi dan Biosistemik MIPA di Universitas Diponegoro, Semarang

### **2. Penyiapan Simplisia**

Sampel yang digunakan adalah buah parijoto (*Medinilla speciosa* B.) dengan krateristik tidak layu, segar, yang di panen asal Bandungan. Buah parijoto (*Medinilla speciosa* B.) yang baru saja dipetik/dipanen dilakukan sortasi untuk memisahkan antara benda asing dan buahnya. Bahan yang sudah disortir kemudian dicuci pada air mengalir kemudian dikeringkan. Buah parijoto yang sudah kering kemudian digiling menjadi serbuk halus, lalu diayak menggunakan mesh ukuran 80, lalu disimpan dalam wadah tertutup kedap agar tidak menyerap air atau menjadi lembab.

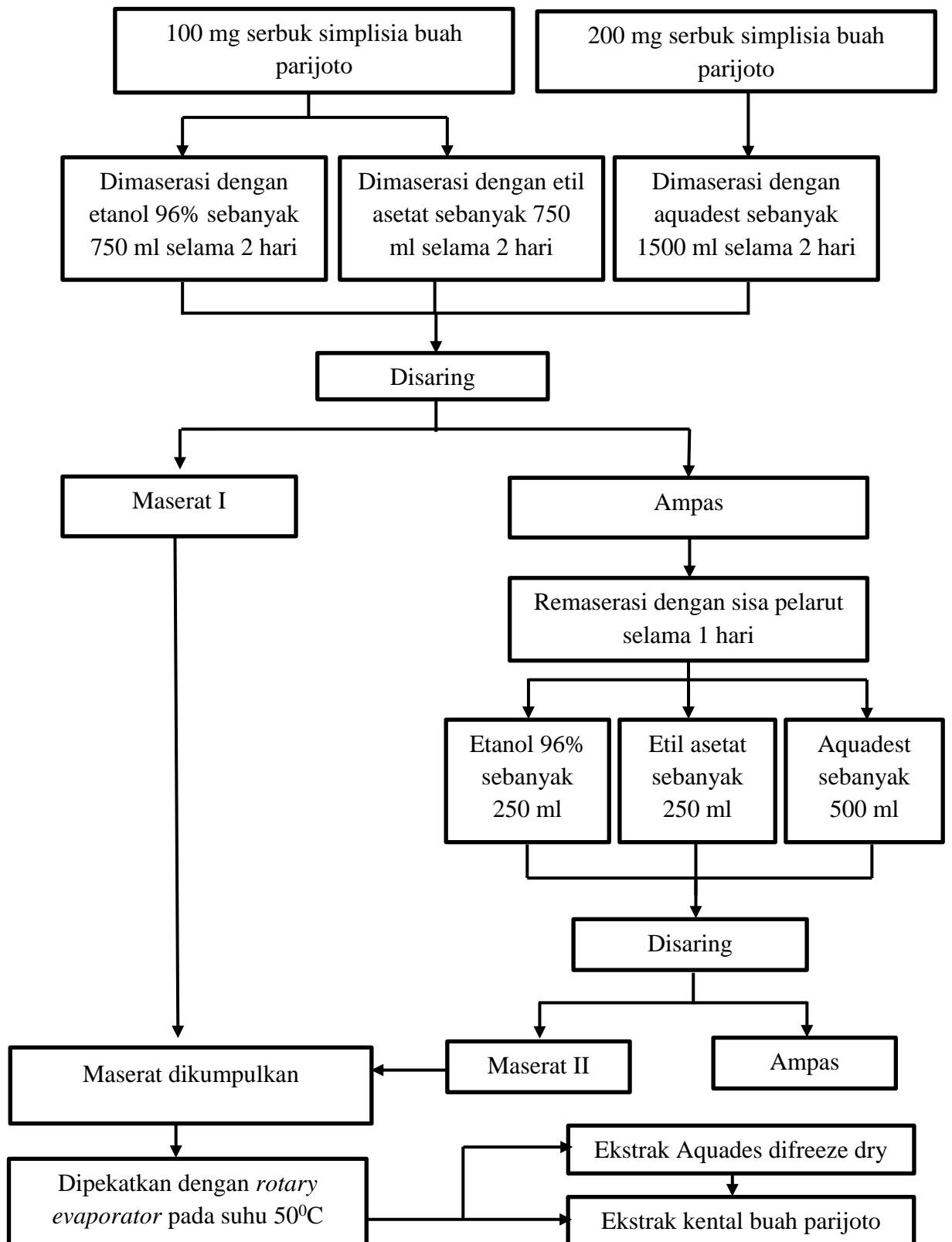
### **3. Pembuatan Ekstrak**

Ekstrak Parijoto dibuat dengan menggunakan metode remaserasi dengan cara menimbang serbuk simplisia dan pelarut dengan perbandingan 1:10. Ekstrak dilakukan dengan 3 pelarut berbeda yakni etanol 96%, air, dan etil asetat. Maserasi kelompok pertama

menggunakan pelarut etanol 96% dengan mengambil 100 gram serbuk dan 1000 ml etanol 96%, maserasi kelompok kedua menggunakan etil asetat dengan menimbang 100 gram simplisia dan 1000 ml etil asetat, dan maserasi kelompok ketiga menggunakan air dengan menggunakan 200 gram serbuk simplisia dan 2000 ml aquadest.

Maserasi dilakukan selama 2 hari dengan menggunakan pelarut sebanyak 750 ml pada kelompok pertama dan kedua sedangkan kelompok ketiga 1500 ml. Maserasi dilakukan 2 kali pengadukan setiap harinya atau setiap 12 jam sekali kemudian disaring dan ampasnya diremasersi pada hari ketiga. Remaserasi hari ketiga dilakukan dengan cara merendam kembali ampas maserasi dengan pelarut 250 ml etanol pada kelompok pertama, 250 ml etil asetat pada kelompok kedua, dan 500 ml pada kelompok ketiga.

Proses perendaman yang telah selesai dilakukan penyaringan dengan kain flanel untuk memisahkan hasil maserasi dengan residu. Filtrat hasil maserasi yang diperoleh kemudian dipekatkan. Pada kelompok pertama (etil asetat) dan kedua (etanol) menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C hingga mendapat ekstrak kental. Kelompok ketiga dikeringkan dengan *freeze dryer* karena air memerlukan suhu 100°C untuk menguap dan pada suhu tersebut dapat merusak antioksidan dalam ekstrak.



Gambar 3.1 Skema Maserasi

#### 4. Skrining ekstrak

Uji skrining dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak. Uji yang dilakukan antara lain uji tanin, saponin dan flavonoid (Noer and Pratiwi, 2016)

##### a. Senyawa flavonoid

Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dengan etanol 96% sampai terlarut, lalu ditambahkan pereaksi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Jika terjadi warna merah, kuning atau jingga menunjukkan adanya flavonoid.

##### b. Senyawa saponin.

Sebanyak 10 mg ekstrak ditambahkan 1 ml air panas dan dididihkan selama 10 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi tertutup kemudian dikocok selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit, ditambah 1 ml HCL 2 M. adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.

##### c. Senyawa tanin.

Bahan sampel ditimbang 10 mg lalu diberi penambahan 10 ml air panas dan dididihkan selama 10 menit. Kemudian saring ekstrak, filtrat ditambahkan 10 ml FeCl<sub>3</sub> 1%. Hasil positif menunjukkan warna biru-hijau kehitaman.

## 5. Evaluasi Penetapan Kadar Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak

### a. Penetapan kadar flavonoid

Pengujian flavonoid ekstrak parijoto (*Medinilla speciosa* B.) menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Menggunakan cara sebagai berikut :

#### 1) Membuat larutan induk kuercetin

Larutan induk baku kuarcetin 1000 ppm dibuat dengan cara 10 mg kuercetin dilarutkan dalam 10 ml etanol 96% dalam labu ukur 10 ml dikocok hingga homogen dan didapatkan larutan baku dengan konsentrasi 1000 ppm.

#### 2) Membuat larutan induk sampel

Larutan induk sampel dibuat terlebih dahulu dengan konsentrasi 1000 ppm atau 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 ml pelarut dalam labu ukur 10 ml dikocok hingga homogen.

#### 3) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Ambillah larutan kuarsetin 100 ppm sebanyak 1 ml, ditambahkan  $AlCl_3$  10% sebanyak 1 ml dan asam asetat 5% sebanyak 8 ml, lalu dibaca menggunakan spektrofotometri Uv-Vis pada panjang gelombang 350-450 nm.



#### 4) Penentuan *Operating Time*

Larutan kuarsetin 100 ppm sebanyak 1 ml, ditambahkan AlCl<sub>3</sub> 10% sebanyak 1 ml dan asam asetat 5% sebanyak 8 ml, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah diperoleh. Dilakukan dengan interval 1 menit sampai 30 menit diperoleh absorbansi yang stabil.

#### 5) Penentuan Kurva Baku Kuarsetin

Membuat larutan standar dengan menggunakan kuarsetin dalam berbagai konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm dari larutan induk dengan cara larutan induk diambil 0,2; 0,4; 0,5; 0,8 serta 1 ml dan diencerkan dengan penambahan pelarut hingga batas dalam labu ukur 10 ml kemudian dikocok hingga homogen. Lalu ambil masing-masing larutan sebanyak 1 ml direaksikan dengan 1 ml AlCl<sub>3</sub> 10% dan 8 ml asam asetat 5%. Diamkan hingga stabil atau sesuai OT kemudian dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometri Uv-Vis pada panjang gelombang maksimum.

#### 6) Penentuan Flavonoid

Masing-masing ekstrak parijoto dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm dipipet sebanyak 1 ml, ditambahkan 1 ml AlCl<sub>3</sub> 10% dan 8 ml asam asetat 5% kemudian didiamkan selama *operating time*. Kemudian lakukan pembacaan absorbansi dengan panjang gelombang maksimum dan

dilakukan 3 kali replikasi. Absorbansi yang didapat dimasukkan ke dalam persamaan linier kuercetin dan dihitung kadar flavanoidnya dengan rumus

$$\frac{\text{Konsentrasi} \times \text{Volume} \times \text{Faktor Pengenceran}}{\text{Bobot Ekstrak}}$$

b. Penetapan aktivitas antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak buah parijoto dilakukan dengan menggunakan DPPH, adapun langkah-langkahnya sebagai berikut :

1) Membuat larutan induk

Larutan induk sampel dibuat terlebih dahulu dengan konsentrasi 1000 ppm atau 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 ml pelarut dalam labu ukur 10 ml dikocok hingga homogen. Larutan induk DPPH 100 ppm dibuat dengan melarutkan 10 mg serbuk DPPH ke dalam etanol 96% pada labu ukur 100 ml. Etanol 96% yang mencapai batas kemudian dikocok hingga homogen. Larutan induk baku kuercetin 1000 ppm dibuat dengan cara 10 mg kuercetin dilarutkan dalam 10 ml etanol 96% dalam labu ukur 10 ml dikocok hingga homogen dan didapatkan larutan baku konsentrasi 1000 ppm

2) Membuat sampel larutan uji

Larutan sampel ekstrak buah parijoto dibuat dalam konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm. Ekstrak baku atau induk diambil masing-masing 0,2; 0,4; 0,5; 0,8 serta 1 ml dan diencerkan dengan penambahan pelarut hingga mencapai batas dalam labu ukur 10 ml kemudian masing-masing dikocok hingga homogen.

3) Membuat larutan baku

Larutan baku dibuat dalam konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm. Larutan induk diambil 0,2; 0,4; 0,5; 0,8 serta 1 ml dan diencerkan dengan penambahan pelarut hingga batas dalam labu ukur 10 ml kemudian dikocok hingga homogen.

4) Membuat larutan DPPH

Larutan DPPH dibuat 0,5 mM dalam pelarut etanol. Larutan dibuat dengan melarutkan 20 mg DPPH dalam etanol sedikit demi sedikit pada labu ukur 100 ml hingga batas labu ukur. Larutan dihomogenkan dengan cara dikocok hingga rata.

5) Penentuan *Operating Time (OT)*

Ambillah larutan kuarsetin 100 ppm sebanyak 1 ml, ditambahkan  $\text{AlCl}_3$  10% sebanyak 1 ml dan asam asetat 5% sebanyak 8 ml, lalu diukur absorbansinya pada panjang

gelombang yang telah diperoleh. Dilakukan dengan interval waktu 2 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

6) Penentuan panjang gelombang maksimal

Larutan DPPH 0,5 mL (sebagai kontrol positif) dimasukkan ke dalam kuvet sebanyak 4 ml kemudian diukur menggunakan spektrofotometri UV Vis. Absorbansi larutan DPPH dicatat pada panjang gelombang 400-800 nm. Larutan blangko atau etanol 96% (sebagai kontrol negatif) juga diukur menggunakan spektrofotometri UV Vis sebanyak 4 ml ke dalam kuvet dan dicatat sama seperti absorbansi larutan DPPH pada panjang gelombang 400-800 nm. Kurva serapan menunjukkan panjang gelombang maksimum.

7) Pengukuran aktivitas antioksidan

Masing-masing larutan uji diambil sebanyak 1 ml ditambahkan larutan DPPH 40 ppm sebanyak 1 ml, lalu ditambahkan 2 ml etanol 96%. Larutan dikocok dan dibiarkan selama 30 menit, dan diukur serapannya di spektrofotometer UV Vis.

Nilai aktivitas antioksidan dinyatakan dalam  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi inhibisi larutan uji terhadap kemampuannya dalam menurunkan aktivitas radikal bebas sebesar 50%. Rumus perhitungan nilai aktivitas penangkal radikal bebas adalah sebagai berikut :

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

Data yang dikumpulkan dibuat kurva regresi linier dengan persamaan  $y = bx + a$  dimana konsentrasi ekstrak dalam ppm adalah absis sumbu x dan nilai % peredaman adalah sumbu y.

### **G. Analisa data**

Data yang diperoleh diolah dan dianalisis dengan menggunakan regresi linier dengan aplikasi SPSS. Penelitian ini menitik beratkan pada pengaruh pelarut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak parijoto dengan variasi pelarut yang berbeda yakni air, etanol 96% dan etil asetat. Data diuji dengan cara pengecekan distribusi dan homogenitasnya secara statistika. Data yang terdistribusi normal dan homogen akan diuji parametrik dengan metode *one way anova* dengan taraf kepercayaan 95% atau nilai P tidak boleh lebih dari 0,05. Sebaliknya data yang tidak terdistribusi normal dan tidak homogen dianalisis secara statistika non parametric *kruskal-wallis* dengan dilihat nilai P. Nilai P dibawah 0.05 menunjukkan hubungan yang signifikan yang akan mengetahui ada tidaknya pengaruh variasi pelarut terhadap aktivitas antioksidan.