

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental, untuk menentukan aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak terpurifikasi Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) berdasarkan nilai IC₅₀ dengan menggunakan metode DPPH

B. Lokasi dan waktu penelitian

1. Lokasi

- a. Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Uji fitokimia dan pembuatan ekstrak buah Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) di Laboratorium Fitokimia Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan variasi perbandingan dan konsentrasi tertentu. Uji aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan menggunakan

perbandingan 1:0, 0:1, 1:1, 1:2, 2:1, dan konsentrasi yang digunakan adalah 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm

2. Variabel tergantung

Variabel yang tergantung dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Nilai IC_{50} dari kombinasi ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) yang menyatakan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH.
- b. Kategori nilai IC_{50} dari kombinasi ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.).

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah cahaya, reagen, waktu, suhu, dan panjang gelombang absorbansi.

D. Alat dan bahan penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi gelas ukur, corong kaca, batang pengaduk, erlenmeyer, kertas saring, neraca analitik, oven, OHAUS, *rotary evaporator*, blender, *waterbath*, corong pisah, labu takar, tabung reaksi, spatula, pipet ukur, vial dan spektrofotometer UV-Vis.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak buah parijoto dan bunga telang, bahan untuk proses ekstraksi Etanol 96%, bahan untuk uji kualitatif kandungan senyawa flavonoid dengan reaksi kimia

metanol, amonia encer dan H₂SO₄ pekat, bahan untuk uji kualitatif kandungan senyawa flavonoid dengan reaksi kimia metanol, amonia encer dan H₂SO₄ pekat, bahan untuk uji aktivitas antioksidan dengan DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) sebagai senyawa radikal bebas, pelarut etanol p.a, pembanding vitamin C.

E. Prosedur penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) dilakukan di di laboratorium Ekologi dan Bioestimatif Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang. Hasil determinasi ini digunakan untuk menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan dapat menjamin kebenaran jenis atau spesies tanaman.

2. Penyiapan simplisia

Buah Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran atau bahan asing sehingga dapat mengurangi jumlah kotoran yang ikut terbawa, kemudian dicuci dengan air mengalir, lalu diangin anginkan hingga tidak ada sisa air. Buah parijoto dipisahkan dengan batang untuk mempercepat proses pengeringan, kemudian dilakukan pengeringan agar simplisia tidak mudah rusak dalam penyimpanan dan mengurangi kadar air dalam simplisia serta menghentikan enzimatis yang dapat menurunkan mutu simplisia. Tahap selanjutnya adalah sortasi kering, bahan uji diblender sehingga diperoleh serbuk halus, tujuan

dari pembuatan serbuk halus agar memperluas permukaan sehingga mempercepat proses ekstraksi.

Penapisan fitokimia :

Dalam penapisan fitokimia ekstrak terdapat parameter standar yaitu parameter spesifik dan parameter non spesifik yang diuraikan sebagai berikut;

a. Spesifik

1) Identitas

Memberikan identitas obyektif dari nama dan spesifik dari senyawa identitas

2) Organoleptik

Penggunaan panca indera mendeskripsikan bentuk, warna, bau, rasa. Pengenalan awal yang sederhana mungkin.

b. Non spesifik

1) Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara serbuk buah parijoto dan bunga telang sebanyak 2 gram diletakkan pada lempeng aluminium foil kemudian dimasukkan pada alat moisture balance selama 10 menit. Dikatakan memenuhi syarat apabila jumlah kadar air yang tertera kurang dari 10% (Utami *et al.*, 2017).

2) Kadar Abu

Simplisia buah parijoto dan bunga telang ditimbang masing masing 2 gram dan dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah ditara, selanjutnya di abukan dalam *muffle furnace* pada suhu $600 \pm 25^{\circ}\text{C}$ selama 3 jam dinginkan dan timbang. Kadar abu total dihitung

terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Utami *et al.*, 2017).

Kadar abu dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ abu} = \frac{\text{Berat abu (g)}}{\text{Berat sampel (g)}} \times 100\%$$

1. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak buah parijoto dan bunga telang dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan cara di timbang serbuk simplisia buah parijoto dan bunga telang masing-masing 300 gram yang telah diblender dan diayak, dilarutkan dalam etanol 96% pelarut yang digunakan sebanyak 3 L (1:10). Maserasi dilakukan dengan cara dengan memasukkan serbuk tanaman wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Maserasi dilakukan selama 1 hari dengan pengadukan sekali dalam sehari dan remaserasi dilakukan selama 2 hari. Ekstrak yang dihasilkan disaring. Fungsi dari penyaringan untuk memisahkan filtrat dan residunya. Filtrat dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50% C sehingga menghasilkan ekstrak kental (Mukhriani, 2014).

Ekstrak kental buah parijoto dan bunga telang ditimbang masing masing 10g dilarutkan dengan menambahkan etanol 96% 100 ml dan dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian ditambahkan n-heksan 100 ml dengan perbandingan 1:1. Melakukan penggojokan corong pisah selama 5 menit dan didiamkan hingga membentuk 2 lapisan pemisah. Proses purifikasi dilakukan sampai variasi pelarut yang digunakan menjadi bening, yang menunjukkan bahwa sampel tersebut sudah tidak ada pengotor. Apabila sudah terbentuk 2 lapisan, selanjutnya mengeluarkan lapisan n-

heksan dari corong pisah. Ekstrak terpurifikasi kemudian diuapkan menggunakan waterbath dengan suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kental terpurifikasi (Kunti & Zulfa, 2020).

2. Uji Skrining Fitokimia Flavonoid

Sebanyak 0,1 gram ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi ekstrak kemudian ditambahkan serbuk Mg dan HCl pekat. Ekstrak mengandung flavonoid jika terbentuknya warna orange, merah, atau kuning (Mayasari & Laoli, 2018).

3. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk memastikan bahwa ekstrak sudah tidak mengandung etanol pada masing-masing ekstrak buah parijoto dan bunga telang. Masukkan masing-masing ekstrak kental ke dalam tabung reaksi yang berbeda kemudian ditambahkan dengan 5 tetes pereaksi asam sulfat (H_2SO_4) dan 2 mL pereaksi kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$). Gojog dan amati perubahan warnanya (Masduqi & Syukur, 2021).

4. Uji aktivitas antioksidan

a. Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH dibuat dengan konsentrasi 100 ppm, dengan cara ditimbang serbuk DPPH sebanyak 5 mg dilarutkan dengan 50 ml etanol p.a dalam labu ukur, volumenya dicukupkan dengan etanol p.a sampai tanda batas (Dillasamola & Linda, 2016).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH dipipet sebanyak 4 ml dari larutan induk 100 ppm masukan dalam labu 10 ml ad dengan menggunakan etanol p.a sampai tanda batas. 1 ml sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan larutan etanol p.a 2 ml dan larutan dpph dari masing masing ppm sebanyak 1 ml lalu tuang ke dalam kuvet sebanyak 3 ml dan diukur pada panjang gelombang 400-800 nm dengan menggunakan spektro UV-Vis (Adrianta *et al.*, 2017).

c. *Operating Time* Larutan DPPH

Larutan DPPH dipipet sebanyak 3 ml dari larutan induk 60 ppm, penentuan *operating time* dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan DPPH yang dicampurkan dengan vitamin C dibaca absorbansinya pada menit ke 1 hingga menit ke 30 pada Panjang gelombang maksimal (Mulangsri *et al.*, 2017).

d. Pembuatan Larutan Blanko

Sebanyak 2 ml larutan DPPH dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan etanol p.a 2 ml diinkubasi dalam ruangan gelap selama *operating time* yang diperoleh , kemudian diukur panjang gelombang yang optimal (Ghozaly & Utami, 2017).

e. Pembuatan Larutan Pembanding

1) Pembuatan larutan induk konsentrasi 100 ppm

Larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm dibuat dengan cara menimbang vitamin C sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan

50ml aquadest dicukupkan volumenya hingga 50ml, volume dicukupkan hingga tanda batas (Damanis *et al.*, 2020).

2) Pembuatan larutan uji seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 ppm

Larutan induk vitamin C sebagai pembanding dibuat seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 ppm. Dari larutan induk 100 ppm dipipet 0,2 ml, 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, 1 ml dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml, lalu dicukupkan volume hingga tanda batas dengan aquadest (Damanis *et al.*, 2020).

3) Pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Sebanyak 2 ml larutan uji pembanding vitamin C dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan dengan larutan DPPH sebanyak 2 ml dan diinkubasi pada ruangan gelap selama *operating time* yang diperoleh, kemudian diukur serapan pada panjang gelombang yang optimal.

f. Pembuatan Larutan Ekstrak Tanaman Buah Parijoto dan Bunga Telang

1) Pembuatan larutan induk konsentrasi 100 ppm

Ekstrak buah parijoto dan bunga telang ditimbang masing masing 5 mg, dilarutkan dengan etanol pa lalu dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml, lalu di cukupkan volume hingga tanda batas dengan metanol.

2) Pembuatan larutan uji seri konsentrasi 20,40,60,80,100 ppm

Larutan uji ekstrak buah parijoto dan bunga telang dengan perbandingan (1:0) (0:1) (1:1) (1:2) dan (2:1). Pada perbandingan (1:0) diambil ekstrak buah parijoto sebanyak 5 mg, pada perbandingan (0:1) diambil ekstrak bunga telang sebanyak 5 mg (1:1) diambil ekstrak buah parijoto sebanyak 2,5 mg dan ditambah ekstrak bunga telang sebanyak 2,5 mg, pada perbandingan (1:2) diambil 1,66 mg ekstrak buah parijoto dan ditambahkan 3,33 mg ekstrak bunga telang, pada perbandingan (2:1) diambil ekstrak buah parijoto sebanyak 3,33 mg dan ditambah 1,66 mg ekstrak bunga telang. Kemudian masing-masing ekstrak tersebut dilarutkan dalam konsentrasi 100 ppm, dari larutan tersebut dibuat deret konsentrasi 20, 40, 60, 80, 10 ppm. Masing-masing larutan uji diambil 2 ml ditambahkan sebanyak 2 ml larutan DPPH lalu dicukupkan volumenya dengan etanol p.a sampai tanda batas labu ukur 10 ml. Campuran didiamkan pada tempat yang terlindung dari cahaya selama operating time yang diperoleh. Larutan dibaca absorbansi pada panjang gelombang yang diperoleh (Mulangsri *et al.*, 2017).

g. Penentuan Persen Inhibisi

Aktivitas penangkal radikal diekspresikan sebagai persen inhibisi yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorban kontrol} - \text{absorban sampel}}{\text{absorban kontrol}} \times 100\%$$

1) Penentuan Nilai IC₅₀ (*inhibitory concentration*)

Konsentrasi sampel dan persen inhibisinya masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dari masing-masing sampel dinyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai nilai IC_{50} (Hindun *et al.*, 2017).

Analisis data statistika menggunakan IBM SPSS Statistic langkah pertama yakni melakukan uji normalitas yang bertujuan untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas dalam penelitian ini menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dikarenakan data yang digunakan kurang dari 50 yaitu 3 kali replikasi dengan taraf uji signifikansi 5% atau 0,05 (Sari *et al.*, 2017). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data yang digunakan dalam analisis telah homogen atau tidak. Uji homogenitas ini dilakukan menggunakan uji Levene, jika p-value menunjukkan hasil $<0,05$ maka H_0 ditolak atau data tidak terdistribusi homogen (Usmadi, 2020). Jika uji homogenitas didapatkan hasil yang tidak homogen maka selanjutnya dilakukan uji non parametrik.

Mann Whitney digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata dua sampel yang tidak berpasangan dengan kriteria pengujian jika nilai *Asymp.Sig (2-tailed)* $< 0,05$ maka H_0 ditolak dan H_a diterima, sedangkan jika nilai *Asymp.Sig (2-tailed)* $> 0,05$ maka H_a ditolak dan H_0 diterima. Analisis data

dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan antara beberapa sampel yang tidak berpasangan dengan kriteria pengujian jika nilai *Asymp.Sig (2-tailed)* $< 0,05$ maka H_0 ditolak dan H_a diterima, sedangkan jika nilai *Asymp.Sig (2-tailed)* $> 0,05$ maka H_a ditolak dan H_0 diterima, sedangkan *Microsoft Office Excel 2010* berfungsi untuk mengetahui ada atau tidak perbedaan nilai rata-rata pH kelompok kontrol dengan kelompok eksperimen berdasarkan diagram batang (Purbawati *et al.*, 2021).

