

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental, untuk menentukan aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dan buah pari-joto (*Medinilla speciosa* Blume) berdasarkan nilai IC_{50} dengan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2,2-pikrilhidrazil).

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Uji fitokimia dan pembuatan ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dan buah pari-joto (*Medinilla speciosa* Blume) di laboratorium fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Uji aktivitas antioksidan di laboratorium instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu: Januari-Februari 2023

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizuz*) dan buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dengan variasi perbandingan dan konsentrasi tertentu. Uji aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizuz*) dan buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dengan menggunakan perbandingan (1:0, 0:1, 1:1, 1:2, 2:1).

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan kombinasi Ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizuz*) dan buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) menggunakan metode DPPH yang ditentukan dengan nilai %inhibisi dan IC₅₀.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah cahaya, waktu ekstraksi, suhu pengentalan, panjang gelombang maksimum dan *operating time*.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ayakan 40, Blender (Cosmos), Batang Pengaduk, neraca analitik (OHAUS), Tabung Reaksi (IWAKI), Rak tabung reaksi, Penjepit kayu, Gelas ukur, Pipet tetes, Corong kaca (IWAKI), Gelas Beaker (HERMA), labu ukur (IWAKI), pipet

ukur 1 ml (PYREX), Palleus ball, *Evaporator Rotary* HOT PLATE (MASPION), Cawan poselen, waterbath, Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu, kertas saring, serbet, tissue, dan spatula.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizuz*) dan buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume), etanol 96%, kuersetin, aquadest, pereaksi dragendrof, pereaksi mayer, serbuk Mg (Magnesium), HCl pekat (asam klorida), alumunium foil, pereaksi FeCl₃ (besi klorida), H₂SO₄ (asam sulfat), K₂Cr₂O₇ (kalium dikromat), asam klorida 2N, NaCl, serbuk DPPH.

E. Prosedur penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizuz*) dan buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang. Hasil determinasi ini digunakan untuk menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan untuk menjamin kebenaran jenis atau spesies tanaman.

2. Pembuatan Simplisia

Buah naga yang sudah terkumpul yang terpisahkan kulit dari buahnya dan buah parijoto yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan sortasi basah terhadap bahan uji untuk memisahkan kotoran atau bahan-bahan asing sehingga dapat megurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan

uji kemudian dicuci dengan air mengalir, lalu diangin-anginkan hingga tidak terdapat sisa air. Kulit buah naga dipotong kecil-kecil dan buah pari-joto yang telah dipilih dikeringkan dengan ditutupi kain hitam menggunakan bantuan sinar matahari langsung, selanjutnya dilakukan sortasi kering (Pradana, 2016). Kulit buah naga merah dan buah pari-joto yang sudah kering diserbuk dengan cara di blender sampai halus. Serbuk diayak menggunakan ayakan dengan derajat kehalusan 40 mesh.

3. Uji Standarisasi Non Spesifik Pada Simplisia

a. Uji Kadar Air Simplisia

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara serbuk kulit buah naga merah dan buah pari-joto sebanyak 2gram diletakkan dilempeng aluminium foil (khusus) kemudian dimasukkan kedalam alat *Moisture Analyzer* yang telah disiapkan pada suhu 105°C selama 5 menit kemudian dicatat hasilnya yang tertera pada *Moisture analyzer*. Dikatakan memenuhi syarat apabila jumlah kadar air yang tertera kurang dari 10% (Sumiati *et al.*, 2019).

b. Uji kadar abu

Penetapan kadar abu dilakukan dengan metode gravimetri dengan cara ditimbang 2 g simplisia kemudian dimasukan ke dalam cawan kursible yang sudah diketahui bobotnya, selanjutnya di abukan dalam tanur listrik pada suhu maksimum 600°C selama 3 jam sampai pengabuan sempurna dan di dinginkan kemudian di timbang sampai bobot tetap (Helilusiatiningsih & Soenyoto, 2020).

Kadar abu dapat dihitung dengan rumus:

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

Keterangan:

berat abu = berat cawan dan sampel setelah pengeringan – berat cawan kosong

berat sampel = berat cawan dan sampel sebelum pengeringan – berat cawan kosong

4. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak kulit buah naga merah dan buah pariijoto menggunakan metode maserasi atau perendaman. Kulit buah naga merah dan buah pariijoto masing-masing ditimbang sebanyak 300 g di maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L (1:5) selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari dilakukan penyaringan untuk mendapatkan filtrat menggunakan kertas saring dan residu diremeserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 600 mL (1:2). Remeserasi dilakukan selama 2 hari. Filtrat dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk memisahkan ekstrak dari cairan penyari dengan suhu 45°C sehingga didapatkan ekstrak kental dan dihitung rendemen (Septiawan *et al.*, 2021).

Perhitungan rendemen:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

5. Uji Kadar Air Pada Ekstrak

Ekstrak kulit buah naga merah dan buah pariijoto ditimbang masing-masing 2 g. Ekstrak dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Syarat kadar air pada ekstrak yaitu $\leq 10\%$. Penentuan kadar air juga berhubungan dengan kemurnian ekstrak (Utami *et al.*, 2017).

Perhitungan kadar air ekstrak:

$$\frac{\text{berat sampel sebelum pemanasan} - \text{berat sampel sesudah pemanasan}}{\text{berat sampel sebelum pemanasan}} \times 100\%$$

6. Uji Bebas Etanol

Pengujian bebas etanol pada ekstrak ini dilakukan secara kualitatif dengan cara memasukkan masing-masing ekstrak kental ke dalam tabung reaksi yang berbeda kemudian ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi asam sulfat (H_2SO_4) dan 1 mL pereaksi kalium dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Syarat ekstrak dikatakan bebas etanol jika warna tetap jingga dan tidak berubah menjadi warna hijau kebiruan (Klau *et al.*, 2021).

7. Uji Skrining Fitokimia

a. Flavonoid

Sampel diambil sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes etanol 96% kemudian diuapkan hingga kering. ditambahkan 0,1gram serbuk Mg dan 10 mL HCl. Apabila terjadi suatu perubahan warna merah/jingga/kuning maka mengandung flavonoid (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

b. Fenolik

Sampel diambil 3 ml dan ditambahkan aquadest panas kemudian didinginkan pada suhu ruang. Setelah dingin ditambahkan 5 tetes larutan NaCl 10% dan 3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan adanya perubahan warna menjadi warna hitam kebiruan/hijau (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

c. Alkaloid

Sampel diambil sebanyak 5 ml dan ditambahkan 1 ml HCl 2N lalu ditambahkan 10 ml air, campur dan panaskan dengan penangas selama 2 menit, didinginkan dan disaring kemudian dibagi menjadi 2 bagian dan dimasukkan kedalam 2 tabung reaksi. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih pada pereaksi mayer dan warna merah jingga pada pereaksi dragendrof (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

d. Tanin

Sampel diambil sebanyak 5 ml kemudian ditetes dengan FeCl₃ 1%. Apabila terjadi suatu perubahan dengan munculnya warna biru kehitaman atau hijau kecokelatan maka mengandung tannin (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

e. Saponin

Sampel diambil sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan HCl 2N sebanyak 5 mL. larutan didinginkan dan dikocok dengan kuat selama 30 detik. Apabila

terbentuk busa yang tidak hilang selama 30 detik menyatakan bahwa adanya saponin (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

8. Penimbangan DPPH (0,4 mM)

Molaritas DPPH yang dibutuhkan adalah 0,4 mM = 0,0004 M (4×10^{-4} M)

BM (Berat Molekul) DPPH = 394,32 g/mol

Volume larutan = 100 ml = 0,1 liter

Penimbangan DPPH = BM DPPH x Vol larutan x Molaritas DPPH = 394,32 g/mol x 0,1 L x 0,0004 = 0,0157728 g → 15,8 mg

9. Pembuatan Larutan DPPH (0,4 mM)

Larutan DPPH 0,4 mM dibuat dengan melarutkan 15,8 mg serbuk DPPH ke 100 mL etanol pa dalam labu. Larutan DPPH yang diperoleh selanjutnya diukur *operating time* dan panjang gelombang maksimumnya (Kurniawati & Sutoyo, 2021).

10. Pengujian DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil*)

a. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 2 mL dalam etanol pa ditambahkan sampai tanda batas etanol pa pada abu ukur 10 ml kemudian didiamkan selama 30 menit ditempat gelap. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara mengukur serapan DPPH dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm untuk memperoleh absorbansi $\pm 0,2-0,8$ (Pamungkas *et al.*, 2017).

b. Penentuan *Operating Time*

Larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 2 mL ditambahkan larutan standar kuersetin 3 ppm sampai tanda batas pada labu ukur 10 mL. Larutan tersebut kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang yang telah diperoleh dengan interval 2 menit sampai diperoleh absorbansi yang paling stabil (Alifni *et al.*, 2017).

c. Pembuatan Larutan Kursetin Sebagai Pembanding

Larutan seri kadar dibuat dengan menggunakan kuersetin sebagai baku standar dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5 ppm. Sebanyak 2 mL larutan standar DPPH 0,4 mM ditambahkan larutan standar kuersetin sampai tanda batas pada labu ukur 10 mL, lalu didiamkan pada tempat yang terlindung dari cahaya selama operating time yang telah diperoleh. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Alifni *et al.*, 2017).

11. Uji Aktivitas Antioksidan

Larutan uji ekstrak kulit buah naga merah dan buah parijoto dengan perbandingan (1:0), (0:1), (1:1), (1:2), dan (2:1). Pada perbandingan (1:0) diambil ekstrak kulit buah naga merah sebanyak 10 mg, pada perbandingan (1:1) diambil ekstrak kulit buah naga merah sebanyak 10 mg dan ditambah ekstrak buah parijoto sebanyak 10 mg, pada perbandingan (1:2) diambil ekstrak kulit buah naga merah sebanyak 10 mg dan ditambah 20 mg ekstrak buah patijoto, pada perbandingan (2:1) diambil 20 mg ekstrak kulit buah naga merah dan ditambahkan 10 mg ekstrak buah parijoto, pada perbandingan (0:1) diambil ekstrak buah parijoto sebanyak 10 mg.

Masing-masing ekstrak dibuat larutan stok seri dengan perbandingan konsentrasinya 1000 ppm, 2000 ppm, dan 3000 ppm. Kemudian dari masing-masing larutan stok dilakukan pengenceran dengan konsentrasi yang sama yaitu 100 ppm dan dibuat seri konsentrasi sebesar 1,2,3,4,5 ppm. Masing-masing larutan uji diambil 2 ml ditambahkan sebanyak 2 ml larutan DPPH 0,4 mM lalu dicukupkan volumenya dengan etanol pa 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 (Pujiastuti *et al.*, 2022).

Perhitungan larutan stok masing-masing konsentrasi:

1000 ppm (1:0) = 10 mg ad 10 ml

2000 ppm (1:1) = 20 mg ad 10 ml

3000 ppm (1:2) = 30 m ad 10 ml

12. Analisis Data

Besarnya aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{Aktivitas DPPH} = \frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Pengujian antioksidan dilakukan replikasi 3 kali, setelah dilakukan pengujian antioksidan data hasil yang diperoleh dioleh menggunakan excel. Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak (ppm) sebagai absis (sumbu x) dan nilai % peredaman (antioksidan) sebagai ordinatonya (sumbu y) sehingga diperoleh nilai IC₅₀ dan dianalisis secara statistik parametrik untuk melihat perbedaan aktivitas antioksidan ekstrak tunggal kulit buah naga merah dan buah pariijoto maupun kombinasi kedua ekstrak tersebut yang dianalisis normalitas data,

homogenitas data dan oneway anova menggunakan metode SPSS versi 16 (Rikantara *et al.*, 2022).