

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain penelitian

Pada penelitian ini desain yang digunakan adalah eksperimental untuk mengetahui adanya pengaruh pelarut ekstraksi terhadap kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak buah bit (*Beta vulgaris* L.) dengan metode spektrofotometri Uv-Vis sehingga nantinya data tersebut dapat digunakan untuk menentukan pelarut yang optimal dalam proses penentuan kadar flavonoid total dalam parameter (mgQE/g) total dan aktivitas antioksidan dalam parameter IC₅₀.

B. Lokasi penelitian

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).
2. Uji kadar flavonoid total, uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan pembuatan ekstrak buah bit (*Beta vulgaris* L.) dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

C. Subjek penelitian

1. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah bit (*Beta vulgaris* L.) yang diperoleh dari Desa Kopeng yang berada di lereng Gunung Merbabu, Kecamatan Getasan, Kabupaten Semarang, Tengah

dipilih secara acak dengan kriteria buah masih segar, tidak busuk, dan tidak terserang hama.

2. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak buah bit (*Beta vulgaris* L.) dengan konsentrasi pelarut etanol 70% dan etanol 96%

D. Definisi Operasional

1. Buah bit yang digunakan pada penelitian ini adalah buah bit yang diperoleh dari Desa Kopeng Kabupaten Semarang.
2. Ekstraksi buah bit pada penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dan etanol 96%.
3. Evaluasi yang dilakukan pada penelitian ini yaitu kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan.
4. Aktivitas antioksidan diuji menggunakan metode DPPH

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah etanol 70% dan etanol 96%

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kandungan flavonoid total (mgQE/g) dan aktivitas antioksidan (IC₅₀) ekstrak buah bit.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah tanaman budidaya, suhu pengeringan, kontrol pembanding kuersetin

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Blender (Philips), toples kaca, cawan porselin, ayakan mesh 40, *rotary evaporator (RE-2000E)*, batang pengaduk, Oven, kain flanel, loyang, Kuvet, batang pengaduk, tabung reaksi (Pyrex), labu ukur, gelas beker, gelas ukur, pipet tetes, corong pisah, neraca analitik (Preeisa XB 220A), pisau, Waterbath dan Spektrofotometer UV-Vis (*Shimazu UV1900*).

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%, buah bit, Aquadest, etanol 96%, DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) diperoleh dari PT. Nitra Kimia AlCl_3 (Merck Germany), asam asetat (Merck, Germany) dan kuersetin (Merck, Germany).

2. Prosedur penelitian

a. Determinasi Tanaman Buah Bit (*Beta vulgaris* L.)

Determinasi tanaman buah bit (*Beta vulgaris* L.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang dengan tujuan untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan utama penelitian dan mencegah kemungkinan tercampur dengan tanaman lain.

b. Pembuatan simplisia

Buah bit yang sudah terkumpul dan sudah terpisahkan kulit dari buahnya setelah itu disortasi basah untuk memisahkan kotoran atau bahan-bahan asing sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji, kemudian dicuci dengan air mengalir, lalu ditiriskan hingga tidak terdapat sisa air. Daging buah bit dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan ditutupi kain hitam menggunakan bantuan sinar matahari hal ini bertujuan agar simplisia tidak langsung terkena paparan sinar matahari supaya tidak merusak senyawa-senyawa yang bersifat termolabil atau tidak tahan suhu tinggi, kemudian dilakukan sortasi kering (Wahdaningsih, 2022). Simplisia yang sudah kering ditimbang dan dibuat serbuk dengan cara di blender sampai halus. Serbuk diayak menggunakan ayakan dengan derajat kehalusan 40 mesh (Rekayasa *et al.*, 2020). Penggunaan ayakan mesh no. 40 mesh bertujuan untuk mendapatkan serbuk simplisia dengan ukuran yang seragam dengan derajat kehalusan sedang hal ini untuk memudahkan proses penyaringan ketika ekstraksi agar saringan yang diperoleh tersaring sempurna tanpa ampas dan untuk mempermudah proses penetrasi pelarut ke dalam sel-sel pada buah bit (Permadi, Sutanto & Wardatun 2015).

c. Pembuatan ekstrak

Serbuk simplisia buah bit yang diperoleh ditimbang sebanyak 200 gram kemudian di maserasi dengan pelarut etanol 70% dan etanol

96% sebanyak 1 liter dengan perbandingan (1:5) sampai seluruh bahan terendam. Maserasi dilakukan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sesekali di aduk, setelah 5 hari dilakukan penyaringan untuk memisahkan antara ampas dengan maserat menggunakan kertas saring. Maserat dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk memisahkan ekstrak dari cairan penyari dengan suhu 50°C dilanjutkan dengan diuapkan di atas waterbath (Wahyudi & Tri, 2023).

3. Uji standarisasi non spesifik

a. Uji kadar air simplisia dan ekstrak

Setelah simplisia kering dilakukan uji kadar air dengan cara menimbang cawan porselin kemudian dilanjutkan dengan menimbang masing-masing 2 gram serbuk simplisia ke dalam oven selama 3 jam dengan suhu 105°C, keluarkan cawan yang berisi simplisia lalu dinginkan dan timbang kembali (Himawan *et al*, 2018). Perhitungan kadar air menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

Keterangan :

a = bobot sampel sebelum dilakukan uji kadar abu (gram)

b = bobot sampel sesudah dilakukan uji kadar abu (gram)

b. Uji kadar abu simplisia dan ekstrak

Uji kadar abu pada buah bit dilakukan dengan cara memasukan 2 gram serbuk simplisia ke dalam kurs porselen yang sebelumnya telah ditimbang, kemudian dipanaskan dengan suhu 600°C selama 3 jam

dengan alat *muffle furnace*, lalu ditimbang sisa abu dan dihitung nilai kadar abu (Anggraeni, 2020).

Kadar abu dapat dihitung dengan rumus :

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

4. Uji bebas etanol 70% dan etanol 96%

Pengujian bebas etanol pada ekstrak etanol buah bit dilakukan secara kualitatif dengan cara memasukan 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 biru kehijauan (Klau *et al.*, 2021).

5. Penetapan kadar flavonoid total secara spektrofotometri UV-Vis

a. Pembuatan larutan induk kuersetin 1000ppm

Larutan induk kuersetin sebanyak 25 mg kemudian dilarutkan menggunakan etanol p.a ke dalam labu ukur 25 mL sampai tanda batas hingga menjadi 1000 ppm.

b. Pembuatan larutan kuersetin 100 ppm

Larutan induk kuersetin 1000 ppm dipipet sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas ke dalam labu ukur 10mL hingga diperoleh konsentrasi 100 ppm.

c. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Larutan kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%

dimasukan ke dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas dikocok hingga homogen. Dilakukan pembacaan dengan spektrofotometri Uv-Vis pada rentang Panjang gelombang 400-500 nm (Winahyu *et al.*, 2018).

d. Penentuan *operating time*

Larutan kuersetin 100 ppm dipipet sebanyak 1 mL, ditambahkan 1 mL $AlCl_3$ 10% dan 8 mL larutan asam asetat 5% masukan sampai tanda batas ke dalam labu ukur 10 mL dikocok hingga homogen. Kemudian dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh pada menit ke 1 sampai menit ke 30 (Bakti *et al.*, 2017).

e. Penentuan kurva baku kuersetin

Larutan standar kuersetin dibuat beberapa konsentrasi yaitu 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, 90 ppm, dan 100 ppm, dipipet sebanyak 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL, 0,9 mL, dan 1 mL. Masing-masing konsentrasi larutan kuersetin dipipet 1 mL, ditambahkan 1 mL $AlCl_3$ 10% dan 8 mL larutan asam asetat 5% masukan etanol p.a sampai tanda batas ke dalam labu ukur 10 mL. Setelah itu diamkan selama waktu optimum, kemudian dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis pada Panjang gelombang maksimum. (Ramadhani *et al.*, 2020).

f. Penentuan Kadar Flavonoid Total

15mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas ke dalam labu ukur 10 mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1.500 ppm di ambil 1 mL, ditambahkan 1 mL $AlCl_3$ 10% dan 8 mL larutan asam asetat 5%. Setelah itu diamkan selama waktu optimum, kemudian dilakukan pembacaan absrobansi dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang maksimum dan dilakukan 3 kali pengulangan (Ramadhani *et al.*, 2020).

6. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH**a. Pembuatan larutan baku induk DPPH 100 ppm**

Larutan baku DPPH 100 ppm dengan menimbang 10 mg serbuk DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

b. Pembuatan larutan 40 ppm dari larutan induk 100 ppm dalam 10 mL

Larutan DPPH 40 ppm dengan cara memipet sebanyak 40 mL larutan DPPH 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen diperoleh konsentrasi larutan 40 ppm (Adrianta, 2020).

c. Penentuan panjang gelombang DPPH

Larutan DPPH 40 ppm dipipet sebanyak 4 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10mL larutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas,

lalu diukur dengan dengan Spektrofotometer UV-Vis dan diamati absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 nm. Spektrum ditentukan panjang gelombang maksimum (Adrianta, 2020).

d. *Operating time* DPPH

Penentuan operating time dengan cara mengambil 4 mL larutan DPPH 40 ppm dimasukan ke dalam labu ukur 10mL larutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas. Kemudian larutan tersebut diukur absorbansinya pada gelombang maksimum yang telah diperoleh pada menit ke 1 sampai menit ke 30 (Bakti *et al.*, 2017).

e. *Pengujian larutan kuersetin sebagai pembanding*

Larutan baku kuersetin 1000 ppm dengan cara menimbang sebanyak 10mg ke dalam labu ukur 10 mL tambahkan etanol pa sampai tanda batas, setelah itu larutan baku diencerkan menjadi 100ppm. Kemudian larutan dibuat seri kadar dengan kosentrasi 4 ppm, 5 ppm, 6 ppm, 7 ppm serta 8 ppm lalu diipipet sebanyak 0,4 mL, 0,5 mL, 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL. Masing-masing kosentrasi diambil sebanyak 1 mL larutan standar kuersetin, ditambahkan 4 mL larutan DPPH kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 10 mL setelah itu pembacaan absorbansi seri kadar menggunakan spektrofotometri uv-vis dengan gelombang maksimum (Susiloningrum dan Sari, 2021).

f. Pengujian Aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% dan 96% buah bit

Larutan ekstrak etanol 70% dan 96% buah bit 1000 ppm dengan cara menimbang sebanyak 10mg kedalam labu ukur 10 mL tambahkan etanol pa sampai tanda batas, setelah itu larutan ekstrak buah bit diencerkan menjadi larutan seri kadar dengan kosentrasi 4 ppm, 5 ppm, 6 ppm, 7 ppm serta 8 ppm dengan memipet sebanyak 0,4 mL, 0,5 mL, 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL. Masing-masing kosentrasi pada setiap kosentrasi dipipet sebanyak 1 mL larutan ekstrak, ditambahkan 4 mL larutan DPPH kemudian larutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 10 mL Kemudian diinkubasi selama *operating time* dan gelombang maksimum yang didapatkan. Setelah itu masing-masing seri kadar diukur nilai absorbansinya pada gelombang maksimum menggunakan Spektrofotometri UV-Vis (Susiloningrum dan Sari, 2021).

7. Pengolahan Data

a. Flavonoid Total

Menghitung kadar flavonoid yang terdapat pada buah bit dapat dihitung dari nilai absorbansi yang diperoleh dari 5 kosentrasi kuersetin dengan persamaan regresi linier: $y = bx + a$

Keterangan :

y = luas kurva

x = kosentrasi sampel

a = intercept (perpotongan garis)

b = slope (kemiringan)

Kadar flavonoid dalam sampel dapat dihitung dengan rumus :

$$C = \frac{C1 \times V \times FP}{m}$$

Keterangan :

C = Total flavonoid(mg/g)

C1 = Konsentrasi kuersetin (mg/L)

V = Volume Sampel

M = berat ekstrak (g)

FP = Faktor pengenceran (L)

b. Antioksidan

Aktivitas Antioksidan diukur dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH. Nilai serapan larutan DPPH sebelum dan sesudah penambahan ekstrak tersebut dihitung sebagai % inhibisi dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan :

A_{kontrol} = adalah absorbansi blangko (tidak mengandung senyawa uji/ekstrak)

A_{sampel} = adalah absorbansi sampel uji/senyawa pembanding.

Laporan uji aktivitas antioksidan dengan DPPH dapat disajikan dalam nilai IC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi antioksidan yang dibutuhkan

untuk menghasilkan penghambatan radikal bebas sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin tinggi aktifitas antioksidan. Nilai IC_{50} diperoleh dari persamaan linier persen penghambatan radikal DPPH terhadap beberapa konsentrasi ekstrak sampel. Persamaan regresi linier yaitu $y = bx + a$.

8. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini adalah untuk menentukan perbandingan kadar flavonoid total dan nilai IC_{50} ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% buah bit. Hasil dari penelitian kemudian dianalisis menggunakan SPSS uji kadar flavonoid total menggunakan uji T-test dan uji aktivitas antioksidan menggunakan One Way Anova. Dalam penelitian akan didapat rata-rata nilai kadar flavonoid total dan IC_{50} yang selanjutnya dibuat grafik dan tabel untuk menentukan nilai perbandingan dari nilai flavonoid total dengan pembanding kuersetin dan nilai IC_{50} ekstrak etanol buah bit dengan nilai IC_{50} kuersetin.