

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan model penelitian eksperimental, yang dilakukan secara kuantitatif. Penelitian dimulai dengan pembuatan ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) untuk dilakukan validasi metode analisa. Selanjutnya, dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat (ABTS).

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro Semarang.
2. Proses pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
3. Uji Validasi Metode Analisa dan uji aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Teknologi, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini yaitu menggunakan ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*). Bunga cengkeh didapatkan dari Desa Giling, Kecamatan Gunungwungkal, Kabupaten Pati.

D. Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
1.	Ekstrak bunga cengkeh	Ekstrak bunga cengkeh dibuat dengan metode maserasi.	-	-	-	-
2.	Presisi	Presisi adalah ukuran konsistensi atau keterulangan hasil yang diperoleh dalam serangkaian pengukuran yang dilakukan dalam kondisi yang sama.	Analisis Kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio	RSD
3.	Akurasi	Akurasi (ketepatan) adalah parameter yang menunjukkan kedekatan antara hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya.	Analisis Kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio	% recovery
3.	Linearitas	Linieritas adalah kemampuan metode analisis untuk menghasilkan respon yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel, baik secara langsung maupun dengan	Analisis Kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio	Koefisien Korelasi (r)

transformasi
matematik

Lanjutan tabel 3.1.

4.	LOD	LOD adalah jumlah terkecil analit sampel masih dideteksi respon signifikan dibandingkan dengan blanko.	adalah terkecil dalam yang bisa dengan yang	Analisis Kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio	ppm
5.	LOQ	LOQ adalah jumlah terkecil analit sampel yang dapat diukur secara akurat dan presisi, memenuhi kriteria untuk pengukuran yang cermat dan konsisten.	adalah terkecil dalam yang dapat secara presisi, kriteria	Analisis Kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio	ppm
6.	IC ₅₀	Nilai penghambatan 50% sampel		ABTS	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio	% inhibisi

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak bunga cengkeh

(*Syzygium aromaticum*).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah validasi metode analisa kadar flavonoid (presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantifikasi, linearitas) dan nilai IC₅₀ ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*).

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah suhu, waktu, metode pengeringan, dan panjang gelombang spektrofotometri UV-Vis.

F. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi blender (Miyako), tabung reaksi (iwaki), rak tabung, pipet tetes, pipet ukur, pipet volume (iwaki), ball pipet, neraca analitik, oven (Binder), Spektrofotometer UV-Vis Single beam 1280 (Shimadzu), *rotary evaporator* (Heidolph), kertas saring Whatman 42, *moisture analyzer* (Ohaus), labu takar (Iwaki Pyrex), ayakan, toples kaca, *waterbath*, *rotary evaporator*(RE 2000E), krus porselen, batang pengaduk, spatula, kuvet, dan beaker glass (iwaki).

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bunga cengkeh (*Syzygium Aromaticum*), aquades (*technical grade*), etanol 96% (*technical grade*), H₂SO₄ pekat, kalium dikromat, kuersetin (*Laboratory Grade*) , AlCl₃ 10%, asam asetat 5%, *serbuk 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat* (ABTS) (*analytical grade*), kalium persulfate (*Laboratory Grade*), etanol p.a (*analytical grade*).

3. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang.

4. Pembuatan Serbuk Simplisia

Bunga cengkeh segar didapatkan dari Desa Giling, Kecamatan Gunungwungkal, Kabupaten Pati, sampel yang digunakan adalah bunga cengkeh yang sudah mekar. Selanjutnya dilakukan sortasi basah dengan cara memisahkan kotoran atau bahan asing yang tidak diinginkan, diikuti dengan proses pencucian menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel sehingga diperoleh bunga yang bersih. Pengeringan dilakukan di bawah sinar matahari secara tidak langsung, dengan cara ditutup dengan kain hitam, hingga kadar air daun mencapai kurang dari 10%. Setelah itu dilakukan sortasi kering untuk memisahkan bahan asing yang dihasilkan dari proses pengeringan, simplisia kering kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan 40 mesh untuk menghasilkan serbuk simplisia yang halus.

5. Uji Standarisasi Non spesifik Simplisia

a. Uji Kadar Air

Sebanyak 2 gram serbuk bunga cengkeh ditimbang dan diletakkan di dalam cawan *moisture analyzer*. Suhu alat disesuaikan ke 105°C, kemudian penutupnya ditutup, tunggu proses berlangsung hingga kadar air terukur, dan hasilnya dicatat (Saraswati & Putra, 2022).

b. Uji Kadar Abu

Sebanyak 2 gram simplisia dipijarkan dalam tanur pada suhu 600°C selama 3 jam. Setelah itu, didinginkan dan ditimbang untuk menghitung kadar abunya, diulang hingga diperoleh bobot stabil (Yana *et al.*, 2022).

Perhitungan Kadar Abu:

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{masa abu(gram)}}{\text{masa simplisia(gram)}} \times 100\%$$

6. Pembuatan Ekstrak Bunga Cengkeh

Sebanyak 300 gram serbuk bunga cengkeh dimaserasi dengan 1500 ml etanol 96%. Simplisia direndam selama 5 hari dan diaduk setiap 8 jam sekali, proses ini dilakukan di kos. Maserat disaring menggunakan kain flannel (Dina *et al.*, 2024). Selanjutnya, dilakukan remaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan jumlah volume 900 ml. Semua maserat yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C sampai didapatkan ekstrak semi kental dan diuapkan lagi menggunakan *waterbath* pada suhu 60°C hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental tersebut kemudian ditimbang untuk menghitung rendemen (Khatimah *et al.*, 2023). Perhitungan rendemen ekstrak yang diperoleh dengan menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{Berat Ekstrak Kental}}{\text{Berat Serbuk Simplisia}} \times 100\%$$

7. Uji Standarisasi non Spesifik Ekstrak

a. Uji Kadar Air Ekstrak

Ekstrak bunga cengkeh ditimbang 2 gram letakkan pada piring aluminium *moisture analyzer*. Alat diatur pada suhu 105°C, kemudian

ditutup. Proses berlangsung hingga lampu halogen pada *moisture analyzer* mati dan hasil penetapan kadar air muncul pada layar alat (Ameliani *et al.*, 2024).

b. Uji Bebas Etanol

Ekstrak bunga cengkeh dicampurkan dengan 2 tetes H₂SO₄ pekat dan 1 ml larutan kalium dikromat. Adanya etanol dalam ekstrak ditandai dengan perubahan warna dari jingga menjadi hijau kebiruan (Adiningsih *et al.*, 2021).

8. Uji Standarisasi Spesifik Ekstrak

a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan panca indra yaitu meliputi, bentuk, warna, bau dan rasa, kemudian catat hasilnya (Yana *et al.*, 2022).

b. Analisa Kualitatif Flavonoid Ekstrak Bunga Cengkeh

Sebanyak 0,5 g ekstrak bunga cengkeh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 4 tetes H₂SO₄ pekat. Perubahan warna yang terjadi diamati menjadi merah bata sampai coklat kehitaman (Kusnadi & Devi, 2017).

9. Penentuan Kadar Flavonoid Total Pada Ekstrak

a. Pembuatan Larutan Standart Kuersetin

Larutan induk kuersetin dengan konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan menimbang sebanyak 50 mg kuersetin p.a secara seksama, kemudian melarutkannya dalam 50 mL etanol p.a menggunakan labu

ukur, digunakan sebagai larutan stok. Selanjutnya larutan standar dengan konsentrasi 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, dan 120 ppm dibuat dari pengenceran bertahap dari larutan induk kuersetin 1000 ppm (Wahyudi & Minarsih, 2023).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{max}) Kuersetin

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan menyiapkan larutan standar kuersetin berkonsentrasi 100 ppm. Sebanyak 1 mL larutan direaksikan dengan 1 mL $AlCl_3$ 10% dalam tabung reaksi. Setelah itu, ditambahkan 3 mL larutan asam asetat 5%. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 350–500 nm (Wahyudi & Minarsih, 2023).

c. Penetapan *Operating time* Kuersetin

Sebanyak 1 mL larutan kuersetin 120 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan direaksikan dengan 1 mL $AlCl_3$ 10%. Kemudian tambahkan 3 mL larutan asam asetat 5% ke dalam campuran tersebut. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya dengan interval waktu setiap 1 menit hingga diperoleh nilai absorbansi yang stabil (Wahyudi & Minarsih, 2023).

d. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Pembuatan kurva baku dilakukan dengan menyiapkan larutan kuersetin dalam konsentrasi bertingkat yaitu 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm. Masing-masing larutan diambil sebanyak 1 mL, lalu ditambahkan

1 mL larutan AlCl_3 10% dan 3 mL asam asetat 5%. Setelah didiamkan sesuai waktu inkubasi yang telah ditentukan (*operating time*), absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS (Wahyudi & Minarsih, 2023).

e. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Sebanyak 50 mg sampel ekstrak bunga cengkeh dilarutkan dengan etanol p.a sebanyak 50,0 ml dalam labu ukur untuk memperoleh konsentrasi 1000 ppm. Setelah itu dipipet 1ml, ditambahkan larutan AlCl_3 10% dan 3 ml asam asetat 5%. Larutan diinkubasi selama *operating time*, absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya (Wahyudi & Minarsih, 2023).

10. Uji validasi Metode Analisis

a. Presisi

Sebanyak 10 mg ekstrak bunga cengkeh ditimbang dan diencerkan dalam labu ukur 10 mL untuk menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan stok diencerkan menjadi 100 ppm dengan cara memipet 1 mL larutan tersebut ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian volumenya diisi hingga tanda batas. Sebanyak 1 mL larutan 100 ppm dicampur dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 3 mL asam asetat 5%, dan diinkubasi selama *operating time*. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan dengan replikasi 7 kali (Alwi, 2017).

b. Akurasi

Ke dalam sampel ekstrak bunga cengkeh 1000 ppm, ditambahkan kuersetin baku dengan konsentrasi 40, 60, dan 100 ppm, dipipet 1 ml kemudian ditambahkan 1 ml aluminium (III) klorida 10% dan 3 ml asam asetat 5%. Larutan diinkubasi selama *operating time*, absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Hasilnya dihitung dalam bentuk persen perolehan kembali (% recovery) (Alwi, 2017).

c. Linieritas

Linieritas diuji dengan menyiapkan larutan stok, kemudian membuat larutan baku kerja dengan konsentrasi 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm. Sebanyak 1 ml larutan dipipet, lalu ditambahkan 1 ml aluminium (III) klorida 10% dan 3 ml asam asetat 5%. Setelah itu, larutan diinkubasi selama *operating time*, dan absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Alwi, 2017).

d. *Limit of detection* (LOD) dan *Limit of Quantitation* (LOQ)

Batas deteksi dan batas kuantitas dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi. Dengan cara mengukur absorbansi larutan baku kerja, dilakukan perhitungan persamaan regresi antara kadar (konsentrasi) dan absorbansi. Selanjutnya, nilai *Limit of*

detection (LOD) dan *Limit of Quantitation* (LOQ) dihitung untuk menentukan sensitivitas metode analisis yang digunakan (Alwi, 2017).

11. Uji Aktivitas Antioksidan Metode ABTS

a. Pembuatan Larutan Stok ABTS

Sebanyak 19 mg ABTS dilarutkan dalam 5 ml air deionisasi, ditimbang 2,7 mg (2,45mM) kalium persulfate dilarutkan dengan 5 ml aqua deionisasi. Selanjutnya, sebanyak 5,0 ml larutan ABTS dicampur dengan 5 ml larutan kalium persulfate kemudian dicukupkan volumenya dengan etanol sampai 25 ml. Larutan kemudian diinkubasi di ruang gelap pada suhu 22-24°C selama 12-16 jam hingga dihasilkan warna biru gelap (Wicaksono, 2021).

b. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum dan Larutan Blanko

Sebanyak 0,3 mL larutan ABTS ditambahkan dengan 5 ml etanol p.a. Kemudian larutan diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 700-800 nm hingga diperoleh panjang gelombang maksimum (Wicaksono, 2021).

c. Pengukuran *Operating time*

Larutan standar kuersetin 3 ppm dipipet sebanyak 0,3ml, lalu ditambahkan 0,3 ml larutan radikal ABTS. Setelah itu, larutan diukur pada panjang gelombang maksimum, dengan interval waktu 1 menit selama 60 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Wicaksono, 2021).

d. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin dan Larutan Intermediet

Larutan induk kuersetin 1000ppm dibuat dengan menimbang sebanyak 10,0 mg standar kuersetin dilarutkan dalam etanol p.a hingga mencapai volume 10,0 ml dalam labu ukur. Pembuatan larutan intermediet 100 ppm dibuat dengan cara diambil 1ml larutan baku induk, kemudian diencerkan dengan etanol p.a hingga volume total mencapai 10,0 ml dalam labu ukur (Wicaksono, 2021).

e. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Dengan Baku Pembanding

Larutan kuersetin dengan konsentrasi awal 100 ppm diencerkan secara bertahap untuk menghasilkan larutan seri dengan konsentrasi 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, dan 6 ppm. Masing-masing larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan etanol p.a hingga mencapai tanda batas. Masing-masing larutan diambil 0,3 ml dan ditambahkan 0,3 ml larutan ABTS kemudian dicukupkan volumenya dengan etanol p.a pada labu ukur 5 ml. Larutan diinkubasi selama *operating time* dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang optimum yang didapatkan (Wicaksono, 2021).

f. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga cengkeh

Larutan baku induk ekstrak etanol dibuat dengan melarutkan 25 mg ekstrak dalam etanol p.a. hingga mencapai volume total 25 mL dalam labu ukur. Selanjutnya dilakukan dengan membuat larutan kerja 100 ppm dengan cara diambil 1ml larutan baku induk kemudian diencerkan dengan etanol p.a pada labu ukur 10 ml. Kemudian, dibuat larutan seri konsentrasi 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, dan 60 ppm.

Masing-masing larutan dipipet sebanyak 0,3 ml, ditambahkan 0,3 ml larutan radikal ABTS, dan dicukupkan volumenya dengan etanol p.a dalam labu ukur 5 ml. Larutan tersebut diinkubasi selama waktu pengoperasian yang ditentukan, lalu serapan diukur pada panjang gelombang maksimum radikal ABTS (Wicaksono, 2021). Persentase aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan rumus (Raharjo *et al.*, 2022) :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{abs kontrol} - \text{abs sampel})}{\text{abs kontrol}} \times 100\%$$

12. Analisis Data

Pengelohan data dilakukan dengan menentukan presisi, akurasi, linieritas, LOD (Limit of Detection) dan LOQ (Limit of Quantification). Hasil validasi metode yaitu akurasi berupa % recovery, presisi berupa koefisien variasi, linearitas berupa koefisien korelasi (r), dan hasil LOD LOQ. Data hasil penelitian diolah dengan menggunakan Microsoft excel dan dapat disajikan dalam bentuk table maupun bentuk lainnya. Perhitungan yang digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan adalah nilai IC₅₀ (Inhibitory concentration). Analisis data dilakukan secara statistic menggunakan SPSS dengan uji Kruskal-wallis.