

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak daun getih-getihan (*Rivina humilis* L.). Tahapan awal dilakukan dengan pembuatan simplisia, kemudian dilanjutkan dengan proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%.

Ekstrak kemudian dilakukan uji flavonoid total dan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*) untuk menentukan nilai IC_{50} . Pengukuran serapan dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi Daun getih-getihan (*Rivina humilis* L.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas Sains dan Matematika Biologi Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan ekstrak daun getih-getihan (*Rivina humilis* L.) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo.
3. Pengujian kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak daun getih-getihan (*Rivina humilis* L.) dilakukan di Laboratorium Instrumen Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Daun getih-getihan (*Rivina humilis* L.) diperoleh dari daerah kecamatan Sumowono Kabupaten Semarang dengan jumlah sebanyak 2 kg.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak daun getih-getihan (*Rivina humilis* L.).

D. Definisi Operasional

Variabel	Definisi operasional	Indikator	Skala pengukuran	Alat ukur
Simplisia daun getih-getihan	Dauh getih-getihan yang telah dikeringkan dengan sinar matahari secara tidak langsung	Waktu pengeringan, bentuk simplisia, warna, bau	Waktu (hari), kategori (warna,bau)	Timer, alat observasi visual
Ekstrak daun getih-getihan	Ekstrak yang diperoleh dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%	Waktu ekstraksi, metode ekstraksi, jenis pelarut	Waktu (hari), Kategori (metode, pelarut)	Alat ekstraksi, timbangan, pelarut etanol
Kadar flavonoid total	Penetapan kadar flavonoid total dalam ekstrak menggunakan spektrofotometri UV-Vis	Absorbansi, panjang gelombang	Absorbansi (angka), Panjang gelombang maksimum (nm)	Spektrofotometer UV-Vis, kuersetin sebagai standar
Aktivitas antioksidan (DPPH)	Uji kemampuan ekstrak dalam menangkap radikal bebas menggunakan metode DPPH	IC50, % inhibisi	IC50 (ppm), Persentase (%)	Spektrofotometer UV-Vis, larutan DPPH

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun getih-getihan (*Rivina humilis* L.) sebesar 60, 80, 100, 120 dan 140 ppm yang digunakan pada uji antioksidan DPPH

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar flavonoid total, aktivitas antioksidan dan Nilai IC₅₀ pada ekstrak daun getih-getihan (*Rivina humilis* L.)

3. Variabel terkendali

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

F. Pengumpulan Data

a. Alat

Timbangan analitik (Ohaus PX 224 E), blender, oven (Memmert UNB 500), botol kaca, Moisture analyzer (Ohaus MB90), Muffle furnace (Thermolyne FB 1410M 33), ayakan mesh 60, kertas saring, rotaty evaporator (RE2000E), waterbath (DHH 8 XMT 204), cawan porselen, gelas ukur (iwaki), beaker glass (iwaki), spatula, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), tabung reaksi, pipet ukur (iwaki).

b. Bahan

Daun getih-getihan (diperoleh di wilayah kecamatan Sumowono kabupaten Semarang), etanol 70% (diperoleh di toko kimia indrasari), etanol p.a, AlCl₃ 2%, asam asetat 5%, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil),

kuersetin, liebermann–Burchard, HCl, Mg, pereaksi dragendorff atau pereaksi mayer, FeCl₃ dan aquadest.

G. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman Getih-getihan (*Rivina humilis* L.)

Identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik, Program Studi Biologi, Fakultas Sains, Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah, guna memastikan keaslian serta ketepatan jenis tanaman getih-getihan (*Rivina humilis* L.).

2. Pembuatan Simplisia

Daun getih-getihan (*Rivina humilis* L.) dipanen dalam kondisi segar dan jadikan ke dalam satu wadah, kemudian daun disortasi dan dicuci setelah itu dipotong menjadi beberapa bagian guna untuk mempermudah proses pengeringan, kemudian dikeringkan dijemur dibawah sinar matahari dan ditutup dengan kain hitam, setelah daun kering giling dengan blender agar lebih mudah diayak dan didapatkan serbuk yang halus. Serbuk di ayak dengan ayakan 60 mesh guna memastikan serbuk simplisia halus. Serbuk disimpan ditempat yang kering, sejuk dan gelap agar kualitas terjaga.

3. Standarisasi Simplisia

a. Uji kadar air

Sebanyak 2 gram simplisia ditimbang menggunakan cawan, dimasukkan kedalam alat moisture analyzer lalu dikeringkan pada suhu 105°C selama 15 menit kemudian didapatkan hasil presentase kadar air pada display digital alat tersebut (Pipit Mulyah *et al.*, 2020).

b. Uji kadar abu

Sebanyak 2 gram simplisia dan ekstrak ditimbang dengan kurs porselen, kemudian dimasukkan kedalam muffle furnace dan diuji dengan pemijaran pada suhu sekitar 600°C selama 3 jam (Pipit Mulyah *et al.*, 2020). Kemudian hasil kadar abu ditimbang dan dihitung menggunakan rumus persamaan 2.

$$\text{Kadar abu total} = \frac{w_2 - w_0}{w_1} \times 100\% \quad (\text{persamaan 2})$$

Ket:

W0: Berat kurs kosong (g)

W1: Berat simplisia awal (g)

W2: Berat kurs + berat simplisia setelah diabukan (g)

4. Pembuatan Ekstrak Daun Getih-getihan (*Rivina humilis L.*)

Serbuk simplisia Daun getih-getihan diekstraksi secara maserasi. Sebanyak 120 g serbuk simplisia ditimbang dan dimasukkan ke dalam wadah maserasi. Sampel kemudian dibasahi dengan sedikit etanol 70% hingga seluruh bagian terendam, lalu didiamkan sekitar 15 menit. Setelah itu, cairan pelarut ditambahkan kembali hingga simplisia benar-benar terendam (1200 mL), kemudian wadah ditutup rapat dan didiamkan selama 3 hari pada suhu ruang, terlindung dari cahaya matahari. Setelah maserasi, campuran disaring, dan ampasnya dimaserasi ulang menggunakan 600 mL pelarut. Filtrat dari proses maserasi dikumpulkan, dikentalkan menggunakan rotary evaporator, kemudian dipekatkan menggunakan waterbath dengan suhu 60°C (Irma *et al.*, 2023).

5. Standarisasi Spesifik Ekstrak

a. Uji Flavonoid

Pengujian flavonoid dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram ekstrak kental, kemudian ditambahkan 2 mL metanol 50%. Campuran tersebut dipanaskan hingga mencapai suhu sekitar 50°C, lalu didinginkan. Selanjutnya, ditambahkan serbuk logam magnesium dan 5 tetes larutan asam klorida (HCl) pekat. Terbentuknya warna merah atau jingga menunjukkan hasil positif adanya senyawa flavonoid (Aljanah et al., 2022).

b. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak kental dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas. Setelah larutan menjadi dingin, dilakukan pengocokan kuat selama kurang lebih 10 detik. Munculnya busa yang stabil setelah penambahan larutan asam klorida (HCl) 2N merupakan indikasi adanya kandungan saponin dalam sampel (Djoko et al., 2020).

c. Uji Steroid

Uji steroid dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram sampel menggunakan 20 mL pelarut non-polar n-heksana. Selanjutnya, ditambahkan 3 tetes pereaksi Liebermann-Burchard ke dalam campuran tersebut. Jika muncul warna hijau, maka dapat diindikasikan adanya kandungan senyawa steroid (Djoko et al., 2020).

d. Uji Tanin

Sebanyak 0,5 gram sampel direbus selama 3 menit. Setelah itu, diambil 2 mL larutan hasil rebusan dan ditambahkan 1-2 tetes larutan asam klorida. Timbulnya warna biru tua atau kehijauan kehitaman menandakan adanya senyawa tanin dalam sampel (Djoko et al., 2020).

e. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditimbang, kemudian ditambahkan 1 mL HCl dan 9 mL akuadest, lalu dipanaskan selama 2 menit. Setelah itu, campuran dibagi ke dalam tiga tabung reaksi secara merata. Tabung pertama ditambahkan 3 tetes reagen Mayer, Tabung kedua ditambahkan 3 tetes reagen Dragendorff, Tabung ketiga ditambahkan 3 tetes reagen Bouchardat, terbentuknya endapan putih hingga kekuningan pada tabung pertama, terbentuk endapan merah bata pada tabung kedua, terbentuknya endapan coklat hingga hitam pada tabung ketiga menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Wulandari *et al.*, 2022).

6. Pengujian Kadar Flavonoid Total

Penetapan kadar flavonoid total dilakukan secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan kuersetin sebagai standar pembanding. Hasil uji dinyatakan dalam satuan kuersetin ekuivalen per gram bahan (mg QE/ g) (Pujiastuti et al., 2022). Tahapan pengujian meliputi:

a. Pembuatan larutan induk kuersetin

Sebanyak 25 mg kuersetin ditimbang, kemudian dilarutkan dalam etanol p.a dalam labu ukur 25 mL hingga mencapai tanda batas. Larutan ini menghasilkan konsentrasi akhir sebesar 1000 ppm.

b. Pembuatan larutan baku kuersetin

Larutan baku kuersetin disiapkan dari larutan induk 1000 ppm. Masing-masing sebanyak 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL, 0,9 mL, dan 1,0 mL larutan induk diambil, kemudian diencerkan dengan etanol p.a hingga volume 10 mL. Dengan demikian, diperoleh larutan baku dengan konsentrasi 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm.

c. Penentuan *operating time* (OT)

Sebanyak 1 mL larutan baku kuersetin 1000 ppm dicampurkan dengan 1 mL larutan AlCl_3 2% dan 8 mL larutan asam asetat 5%. Larutan tersebut kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum hingga diperoleh waktu reaksi yang menunjukkan absorbansi stabil.

d. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum (λ maks)

Larutan baku kuersetin 60 ppm sebanyak 1 mL ditambahkan 1 mL larutan AlCl_3 2% dan 8 mL larutan asam asetat 5%, kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 370–450 nm. Panjang gelombang dengan absorbansi tertinggi ditetapkan sebagai panjang gelombang maksimum yang digunakan untuk pengukuran sampel.

e. Penentuan kurva baku kuersetin

Masing-masing larutan baku kuersetin dengan konsentrasi 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung vial. Setiap vial ditambahkan 1 mL AlCl_3 2% dan 8 mL asam asetat 5%, kemudian dikocok dan didiamkan sesuai waktu optimum yang telah ditentukan. Selanjutnya, absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum.

f. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Daun Getih-getihan

Larutan uji ekstrak disiapkan dengan cara menimbang 25 mg ekstrak daun getih-getihan, kemudian dilarutkan dalam labu ukur 25 mL menggunakan etanol p.a hingga mencapai tanda batas, sehingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 1000 ppm.

g. Pengujian Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Getih-getihan

Larutan uji sebanyak 1 mL diambil, kemudian ditambahkan 1 mL AlCl_3 2% dan 8 mL asam asetat 5% dilakukan tiga replikasi. Campuran dikocok hingga homogen dan didiamkan selama waktu optimum pada suhu ruang sesuai waktu optimum yang telah ditentukan. Selanjutnya, absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

7. Pengujian Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan Larutan Induk DPPH

Larutan DPPH disiapkan dengan menimbang 4 mg DPPH, kemudian dilarutkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan etanol

p.a sampai tanda batas. Dihasilkan konsentrasi larutan DPPH 40 ppm. (Aiyuba *et al.*, 2023).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan induk DPPH disiapkan dengan mengambil 4 mL larutan tersebut dan menambahkannya dengan 1 mL etanol p.a ke dalam vial. Setelah itu, larutan dimasukkan ke dalam kuvet dan absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 500 hingga 600 nm (Aiyuba *et al.*, 2023).

c. Penentuan Operating Time

Sebanyak 4 mL larutan induk DPPH dicampurkan dengan 1 mL larutan standar kuersetin 3 ppm. Campuran tersebut kemudian diukur nilai serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya. Pengukuran dilakukan hingga diperoleh nilai absorbansi yang stabil (Aiyuba *et al.*, 2023).

d. Pembuatan Larutan Blangko DPPH

Sebanyak 4 mL larutan induk DPPH dimasukkan ke dalam vial, kemudian ditambahkan 1 mL etanol p.a. Selanjutnya, larutan dimasukkan ke dalam kuvet dan absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh (Aiyuba *et al.*, 2023).

e. Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

Sebanyak 10 mg kuersetin dilarutkan dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan etanol p.a hingga mencapai tanda batas. Larutan dikocok hingga tercampur sempurna, menghasilkan larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm. Untuk membuat larutan seri, diambil masing-masing 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, dan 0,5 mL dari larutan induk, lalu diencerkan dengan etanol p.a hingga volume 10 mL. Dari proses ini diperoleh larutan kuersetin dengan konsentrasi berturut-turut 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm (Aiyuba *et al.*, 2023).

f. Pengujian Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding Kuersetin

Sebanyak 1 mL larutan kuersetin dari masing-masing konsentrasi dipipet, lalu ditambahkan 4 mL larutan DPPH. Setelah itu, larutan diinkubasi pada suhu kamar di tempat yang tidak terkena cahaya selama 47-56 menit. Terakhir, absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya (Aiyuba *et al.*, 2023).

g. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Ekstrak Daun Getih-getihan

Sebanyak 100 mg ekstrak daun getih-getihan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan etanol p.a hingga mencapai garis batas. Larutan dikocok hingga homogen sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan induk tersebut, dibuat lima variasi konsentrasi dengan mengambil masing-masing 0,6 mL, 0,8 mL, 1 mL, 1,2 mL, dan 1,4 mL, lalu

diencerkan menggunakan etanol p.a hingga volume 10 mL. Konsentrasi akhir larutan yang dihasilkan yaitu 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm, dan 140 ppm (Aiyuba *et al.*, 2023).

h. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Getih-getihan

Larutan uji dengan kuersetin sebagai kontrol positif. Masing-masing konsentrasi larutan uji ekstrak sebanyak 1 mL dipipet ke dalam vial, kemudian ditambahkan 4 mL larutan DPPH 40 ppm dan dicampur hingga homogen. Campuran tersebut diinkubasi di tempat gelap yang terlindung dari cahaya. Setelah inkubasi selesai, absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh (Aiyuba *et al.*, 2023).

H. Analisis Data

1. Penentuan Kadar Flavonoid Total

Menurut Pujiastuti *et al.*, (2022) Penentuan nilai flavonoid total dihitung berdasarkan rumus persamaan 3.

$$\text{Flavonoid total} = \frac{c \cdot v \cdot fp}{g} \quad (\text{Persamaan 3})$$

Keterangan :
c = konsentrasi sampel
v = volume ekstrak yang digunakan
fp = factor pengenceran
g = berat sampel

2. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Penentuan nilai IC₅₀ aktivitas antioksidan dilakukan berdasarkan hasil pengukuran absorbansi dari seri konsentrasi, yang kemudian

digunakan untuk menghitung persentase inhibisi. Persentase inhibisi dari konsentrasi ekstrak tersebut dihitung menggunakan persamaan

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Serapan blanko} - \text{serapan sampel}}{\text{serapan blanko}} \times 100\%$$

Konsentrasi ekstrak dan persentase inhibisi diplot masing-masing pada sumbu x dan y, kemudian persamaan garis yang dihasilkan digunakan untuk menentukan nilai Inhibition Concentration 50% (IC₅₀) (Suryani *et al.*, 2015). Nilai IC₅₀ dengan y sebagai 50 dihitung menggunakan persamaan:

$$y = bx + a$$

3. Analisis Data Secara Statistik

Analisis data dilakukan menggunakan beberapa uji statistik. Uji Normalitas digunakan untuk mengevaluasi normalitas distribusi data dari tiap kelompok konsentrasi ppm ekstrak daun getih-getihan. Jika $p > 0,05$ maka data terdistribusi normal, jika $p < 0,05$ maka data tidak terdistribusi normal. Setelah itu, dilanjutkan dengan Homogenitas untuk mengevaluasi homogenitas dari tiap kelompok, jika $p > 0,05$ maka data homogen, jika $p < 0,05$ maka data tidak homogen. Apabila terdapat kelompok data yang tidak memenuhi asumsi normalitas, maka analisis dilanjutkan dengan uji non-parametrik. Uji Kruskal-Wallis digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok konsentrasi ekstrak. Jika diperoleh nilai $p < 0,05$, maka dilakukan uji lanjut Mann-Whitney antar kelompok untuk mengetahui letak perbedaan yang signifikan secara spesifik.