

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Dalam penelitian ini desain yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium. Tahap penelitian dimulai dengan ekstraksi Bunga Rosella Merah menggunakan metode ekstraksi maserasi, kemudian dilanjutkan tahap kedua yaitu analisis kualitatif flavonoid dan fenolik Bunga Rosella Merah dalam menggunakan metode reaksi warna dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Tahap selanjutnya adalah analisis kuantitatif menggunakan Spektrofotometri UV-Vis, yang keduanya didukung dengan literatur dan pustaka yang sesuai dengan judul. Pada pengujian kuantitatif kadar flavonoid total dan fenolik total dilakukan tiga kali replikasi.

B. Waktu Dan Tempat

1. Lokasi penelitian

- a. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
- b. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Jurusan Biologi Fakultas MIFA Universitas Diponegoro Semarang.

2. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni hingga Juli 2019.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Bunga Rosella Merah yang diambil dari kedua daerah yang berbeda yang berasal dari Kabupaten Bengkulu Tengah dan Kabupaten Semarang.

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar flavonoid total dan fenolik total ekstrak etanol Bunga Rosella Merah Variabel tergantung

Tempat tumbuh, struktur tanah, iklim/cuaca, perawatan tanaman, waktu panen tanaman.

D. Alat Dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam Penelitian ini yaitu Blender (Philips), ayakan nomor 40, cawan porselin, kain flanel ,toples kaca, *rotary evaporator* (Rotavapor® R-300), waterbath (memmert wnb 6), Spektrofotometri UV-Vis (Shimazu), batang pengaduk, kuvet, tabung reaksi, labu ukur, gelas beker, gelas ukur, pipet tetes, corong pisah, chamber (Pyrex®), lampu UV 254 nm dan 366 nm, neraca analitik (Preeisa XB 220A), dan lempeng KLT Silika Gel GF₂₅₄.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam Penelitian ini yaitu, serbuk simplisia Bunga Rosella Merah, etanol 70% p.a (emparta®), aquades, n-butanol

p.a (E-Merck), asam asetat (emprove®), FeCl₃ p.a (E-Merck), AlCl₃ p.a (E-Merck), n-heksan p.a (E-Merck), reagen folin-ciocalteu p.a (E-Merck), NaCO₃ p.a (E-Merck), Asam Galat (Sigma®), dan Kuersetin (sigma®).

E. Prosedur kerja penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman Bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* L.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang dan Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Bengkulu dengan tujuan untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan utama penelitian dan mencegah kemungkinan tercampur dengan tanaman lain.

2. Proses Ekstraksi

a. Pengambilan Dan Pengolahan Sampel

1) Kriteria inklusi

Sampel bunga rosella diambil di desa Pekik Nyaring Kabupaten Bengkulu Tengah dan Desa Dopleng Kabupaten Semarang yaitu bunga rosella yang sudah siap panen dengan umur tumbuhan 3-4 bulan, bunga masih dalam keadaan kuncup, berwarna merah pekat.

2) Besar sampel

Jumlah sampel simplisia Bunga Rosella Merah segar yang digunakan masing-masing daerah sebanyak 3 kg kelopak bunga

rosella merah asal Kabupaten Bengkulu Tengah dan Kabupaten Semarang.

3) Cara pengambilan sampel

Pada penelitian ini adalah sampel dengan jenis dan cara penambihan yang sama, diambil pada pagi hari, bunga yang masih dalam keadaan kuncup dan berwarna merah pekat sehingga mempunyai kesempatan yang sama untuk dipilih sebagai sampel.

4) Cara Pembuatan Simplisia

Bunga rosella merah yang masih segar dikumpulkan kemudian dipisahkan dari biji dan daun, diambil kelopak bunganya saja, dicuci bersih, disortasi basah untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, selanjutnya dilakukan proses pengeringan, dijemur di bawah sinar matahari yang sebelumnya ditutupi kain hitam terlebih dahulu untuk mencegah hilangnya zat aktif. Setelah itu simplisia yang kering disortasi kering agar menghilangkan kotoran, dihaluskan, diayak dengan mesh nomor 40, dan ditimbang berat serbuk kering bunga rosella merah keseluruhannya. Fungsi dari pembuatan simplisia agar mempermudah penarikan metabolite sekunder. Semakin halus serbuk simplisia maka penarikan metabolite sekunder akan semakin mudah, efektif dan efisien.

b. Pembuatan ekstrak dengan metode maserasi

Serbuk simplisia kering ditimbang masing-masing sebanyak 500 gram serbuk Bunga Rosella Merah asal Kabupaten Bengkulu Tengah dan 500 gram asal Kabupaten Semarang, serbuk simplisia Bunga Rosella Merah dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan (1:5) (w/v). Kemudian dimasukan serbuk Bunga Rosella Merah yang akan disari kedalam bejana maserasi Ditambahkan etanol 70% sebanyak 1875 ml (3,5 bagian) kedalam masing-masing bejana maserasi yang berisi serbuk Bunga Rosella Merah. Kemudian biarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia selama 2-3 hari sesekali dilakukan pengadukkan setiap 6 jam sekali. Proses maserasi dilakukan di ruangan yang terlindungi dari sinar matahari. Ampas dari hasil maserasi kemudian, diremaserasi sebanyak 1 kali selama 1 hari dengan pelarut etanol 70% sebanyak 625 ml (1,5 bagian) sambil dilakukan pengadukan setiap 6 jam sekali. Larutan hasil penyaringan (filtrat) yang masih bercampur dengan pelarut Selanjutnya dipisahkan dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan tekanan 100 mBar sampai pelarut tidak menetes dan didapatkan ekstrak bunga rosella merah (Suzery *et al.*, 2010). Perhitungan rendemen dapat digunakan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

c. Purifikasi n-heksan

Ekstrak kental ditimbang 20 gram dilarutkan dengan 20 ml etanol 70% dan akuades 20 ml, kemudian dimasukkan dalam corong pisah ditambah n-heksan 100 ml. Kemudian digojog kurang lebih satu menit dan didiamkan beberapa menit hingga terbentuk lapisan, Filtrat yang diperoleh dimasukkan kembali ke dalam corong pisah, kemudian difraksi kembali dengan n-heksan sebanyak tiga kali pengulangan hingga diperoleh fraksi bening. Kemudian hasil dari fraksi dipisahkan hingga diperoleh filtratnya dan dihitung rendemen (Palupi, 2018)

3. Uji kualitatif Flavonoid dan Fenolik

a. Uji Kualitatif dengan Metode Uji Warna

1) Uji flavonoid

10 mg ekstrak ditambahkan 4 mL etanol 70% (p.a) hingga ekstrak larut (Depkes RI, 1995): sebanyak 2 mL larutan uji ditambahkan 0,5 gram serbuk seng, kemudian ditambahkan 2 mL HCl 2N, didiamkan 1 menit. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat. Dikocok perlahan, kemudian didiamkan 2-5 menit. Hingga terbentuk warna merah intensif (positif flavonoid).

2) Uji Fenolik

10 mg ekstrak ditambahkan 4 mL etanol 70% (p.a) hingga ekstrak larut (Depkes RI, 1995): Sebanyak 2 mL larutan ekstrak etanol bunga Rosella dari masing-masing tempat tumbuh

ditambah dengan pereaksi FeCl_3 sebanyak 3 tetes. kemudian didiamkan 2-5 menit. Hingga terbentuk warna merah, biru, hijau hitam menunjukkan adanya polifenol.

b. Uji kualitatif dengan menggunakan KLT

1) Uji flavonoid

Ekstrak etanol Bunga Rosella Merah masing-masing ditimbang sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam etanol p.a, kemudian ekstrak ditotolkan pada lempeng KLT, masukan lempeng tersebut dalam wadah bejana yang berisi fase gerak n-heksan : etil asetat (1:4) yang telah dijenuhkan, selanjutnya biarkan fase gerak merambat sampai tanda batas. Kemudian keluarkan lempeng ditunggu sampai kering dulu, lalu disemprotkan AlCl_3 dan preaksi situborat. Hasil elusi diamati dengan lampu UV 254 nm dan 365 nm yang menunjukkan warna-kuning, sebagai zat pembanding digunakan kuersetin (Islamiyati dan Saputri, 2018).

2) Uji fenolik.

Ekstrak Bunga Rosella Merah masing-masing ditimbang sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam etanol p.a ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dengan menggunakan pelarut n-butanol : asam asetat : akuadest (4:1:5), kemudian diamati bercak pada lampu UV dan disemprot dengan reagen besi (III) klorida (FeCl_3). Positif mengandung fenol jika noda berwarna hijau,

merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat. Zat pembanding digunakan asam galat (Ahmad *et al.*, 2015).

4. Uji kuantitatif Penetapan kadar Flavonoid total dengan Spektrofotometri Uv-Vis

a. Pembuatan Reagen

1) Pembuatan Larutan Induk Kuersetin (1000 ppm)

Ditimbang serbuk kuersetin sebanyak 25 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga volume 25 mL.

2) Pembuatan Pereaksi AlCl_3 10%

Ditimbang sebanyak 1 gram AlCl_3 padat dilarutkan dengan aquadest steril hingga 10 mL.

3) Pembuatan Larutan Asam Asetat 5 %

Sebanyak 0,5 ml asam asetat dilarutkan dengan aquadest sebanyak 10 mL (Putra *et al.*, 2018).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum pada larutan standar kuersetin

Dibuat larutan baku kuersetin (1000 ppm) dengan cara menimbang 25 mg kuersetin larutkan dalam 25 ml etanol p.a, kemudian buat larutan dengan konsentrasi 40 ppm dengan cara dipipet 0,4 ml dari larutan baku kuersetin 1000 ppm dan ditambahkan etanol p.a kedalam labu 10 ml ad tanda batas. diambil sebanyak 1 mL, tambahkan 3 ml etanol p.a, 0,2 AlCl_3 , 0,2 asam asetat dan 5,6 ml aquadest pada masing-masing konsentrasi. Pembacaan dilakukan

dengan Spektrofotometri Visibel pada panjang gelombang 300-600 nm.

c. Penentuan *Operating Time*

Larutan kuersetin 40 ppm diambil sebanyak 1 mL Kemudian ditambahkan 3 ml etanol p.a, 0,2 AlCl₃, 0,2 asam asetat dan 5,6 ml aquadest. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah diperoleh dengan interval pada waktu 30 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

d. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan seri kadar dibuat dengan menggunakan kuersetin dengan konsentrasi 1000 ppm sebagai baku standar. Dibuat seri kadar lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml masing – masing di pipet sebesar 0,2, 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, dan 1 ml (20,40, 60, 80, dan 100 ppm) lalu ditambahkan etanol p.a hingga 10 ml. kemudian di pipet sebanyak 1 mL larutan seri kadar dari masing-masing konsentrasi ditambahkan 3 ml etanol p.a, direaksikan dengan 0,2 ml AlCl₃, 0,2 ml asam asetat dan 5,6 ml aquadest pada masing – masing konsentrasi didiamkan selama waktu optimum, dilakukan pembacaan.

e. Penentuan kadar Flavonoid total pada sampel dengan spektrofotometri vis

Sebanyak 25 mg ekstrak etanol bunga rosella lalu dilarutkan dalam 25 ml etanol 70% maka didapat konsentrasi larutan 1000 ppm, untuk konsentrasi 100 ppm dipipet 2,5 ml dan cukupkan sampai 25 ml

dengan etanol 70%. Larutan ekstrak etanol Rosella Merah 100 ppm ditambahkan 3 ml etanol p.a, 0,2 ml AlCl_3 , 0,2 ml asam asetat 1 M dan 5,6 ml akuades, inkubasi selama 16 menit pada suhu kamar kemudian dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang maksimum. Dilakukan 2 kali pengulangan.

5. Penetapan Kadar Fenolik Total.

a. Pembuatan Reagen

1) Pembuatan larutan induk asam galat (500 ppm)

Sebanyak 50 mg asam galat dilarutkan dalam etanol (p.a), ad 100 mL.

2) Pembuatan reagen Na_2CO_3 7,5%

Ditimbang sebanyak 7,5 gram Na_2CO_3 ditambahkan 100 mL aquadest, kemudian dididihkan sampai serbuk Na_2CO_3 larut sempurna. Setelah itu diamkan selama 24 jam, disaring dan diencerkan dengan aquadest sampai volume 100 mL.

b. Penentuan Panjang Gelombang Absorbansi Maksimum Pada Larutan Standart Asam Galat

Pembuatan larutan standar asam gallat dilakukan dengan melarutkan Sebanyak 0,3 mL larutan asam galat konsentrasi 100 ppm ditambah 1,5 mL reagen Folin Ciocalteau, kemudian digojog dan didiamkan selama 3 menit. Ke dalam larutan tersebut ditambah 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5%, digojog hingga homogen, kemudian

absorbansinya diukur pada panjang gelombang 600-850 nm (Chief *et al.*, 2018).

f. Penentuan *Operating Time*

Sebanyak 0,3 mL larutan asam galat konsentrasi 100 ppm ditambah 1,5 mL reagen Folin Ciocalteau, kemudian digojog dan didiamkan selama 3 menit. Ke dalam larutan tersebut ditambah 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5%, digojog homogen, dan diukur absorbansinya dalam rentang waktu 0-60 menit pada panjang gelombang maksimum.

g. Pembuatan kurva baku asam galat dengan reagen folin-ciocalteau

Sebanyak 0,3 mL larutan asam galat konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm masing-masing dimasukkan dalam tabung, kemudian ditambah 1,5 mL reagen Folin Ciocalteau dan digojog. Setelah didiamkan selama 3 menit, masing-masing larutan ditambah 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5% digojog homogen, dan didiamkan pada range *operating time* pada suhu kamar. Semua larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum, kemudian dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi asam galat (ppm) dengan absorbansi.

h. Penetapan kadar Fenolik total pada sampel dengan spektrofotometri Visibel

Sebanyak 25 mg ekstrak etanol bunga rosella lalu dilarutkan dalam 25 ml etanol 70% maka didapat konsentrasi larutan 1000 ppm, untuk konsentrasi 100 ppm dipipet 2,5 ml dan cukupkan sampai 25 ml dengan etanol 70%. Larutan ekstrak 100 ppm ditambahkan 1,5 mL reagen Folin-Ciocalteu dan digojog. Didiamkan selama 3 menit, ditambah 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5% dan didiamkan lagi pada range *operating time* pada suhu kamar. Absorbansi larutan ekstrak diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang absorbansi maksimum. Dilakukan 2 kali pengulangan.

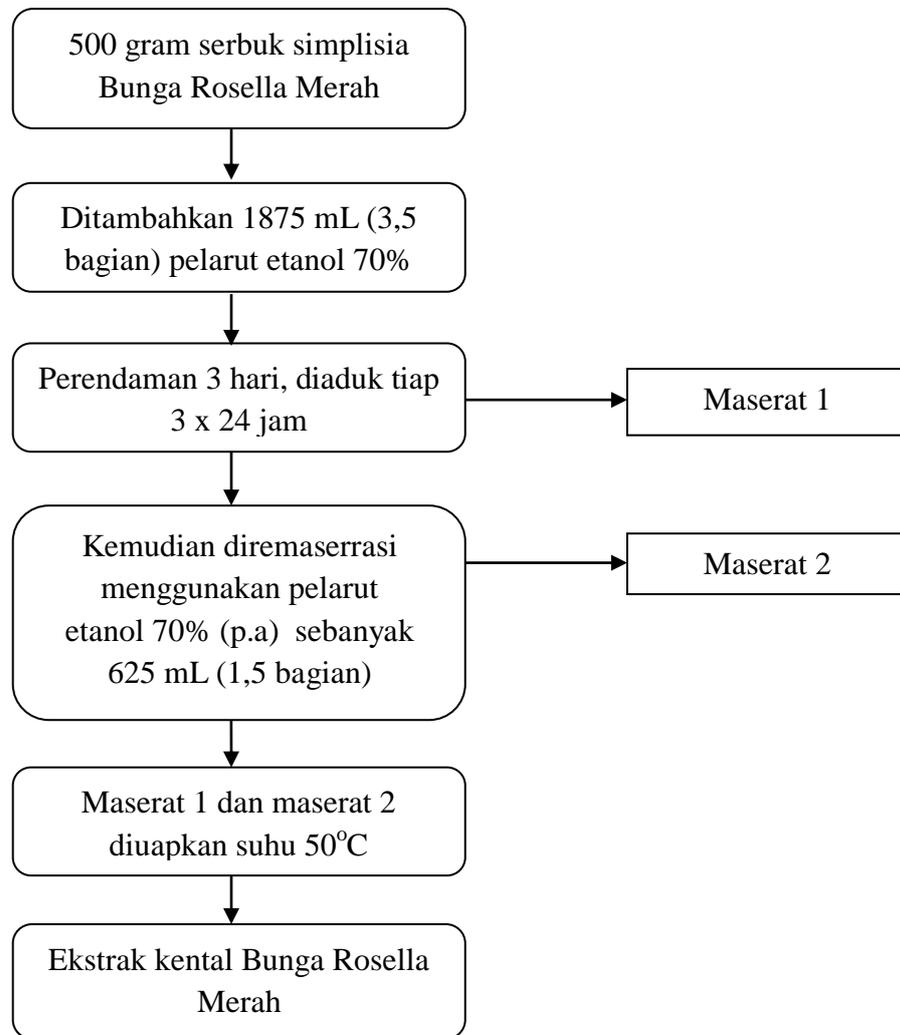
F. Analisis data

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis secara kualitatif menggunakan metode KLT untuk membuktikan bahwa ekstrak yang diperoleh mengandung flavonoid dan fenolik kemudian dianalisis secara kuantitatif menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis untuk menentukan kadar flavonoid total dan fenolik total dari metode ekstraksi maserasi. Secara kuantitatif, data deret konsentrasi yang dibuat dari baku kuersetin untuk flavonoid total dan asam galat untuk fenolik total kemudian dibuat persamaan kurva baku. Persamaan kurva baku $y = bx + a$ dengan $y =$ absorbansi dalam nm, $x =$ kadar dalam ppm (mg/L). Absorbansi ekstrak etanol Bunga Rosella Merah yang telah diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan kurva baku sehingga didapatkan kadar flavonoid total dan fenolik total Bunga Rosella Merah. Data

kadar flavonoid dan fenolik total ekstrak etanol Bunga Rosella Merah dari metode maserasi dianalisis secara statistik menggunakan uji T (*independent sampel T-test*) dideskripsikan.

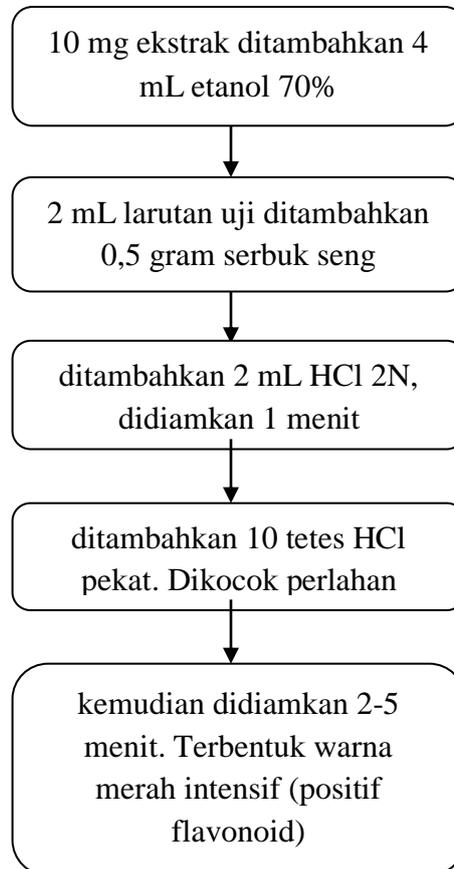
G. Diagram Alir Penelitian

1. Pembuatan Larutan Ekstrak Menggunakan Metode Maserasi



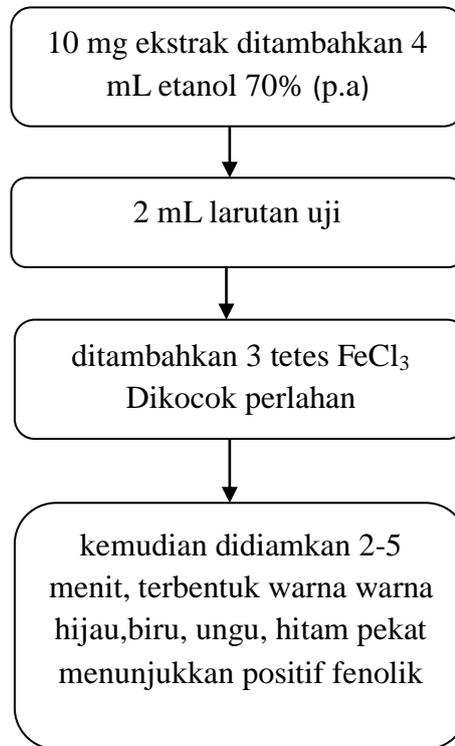
Bagan 3.1 Pembuatan Ekstrak Bunga Rosella Merah

2. Analisis Kualitatif Flavonoid Dengan Metode Reaksi Warna



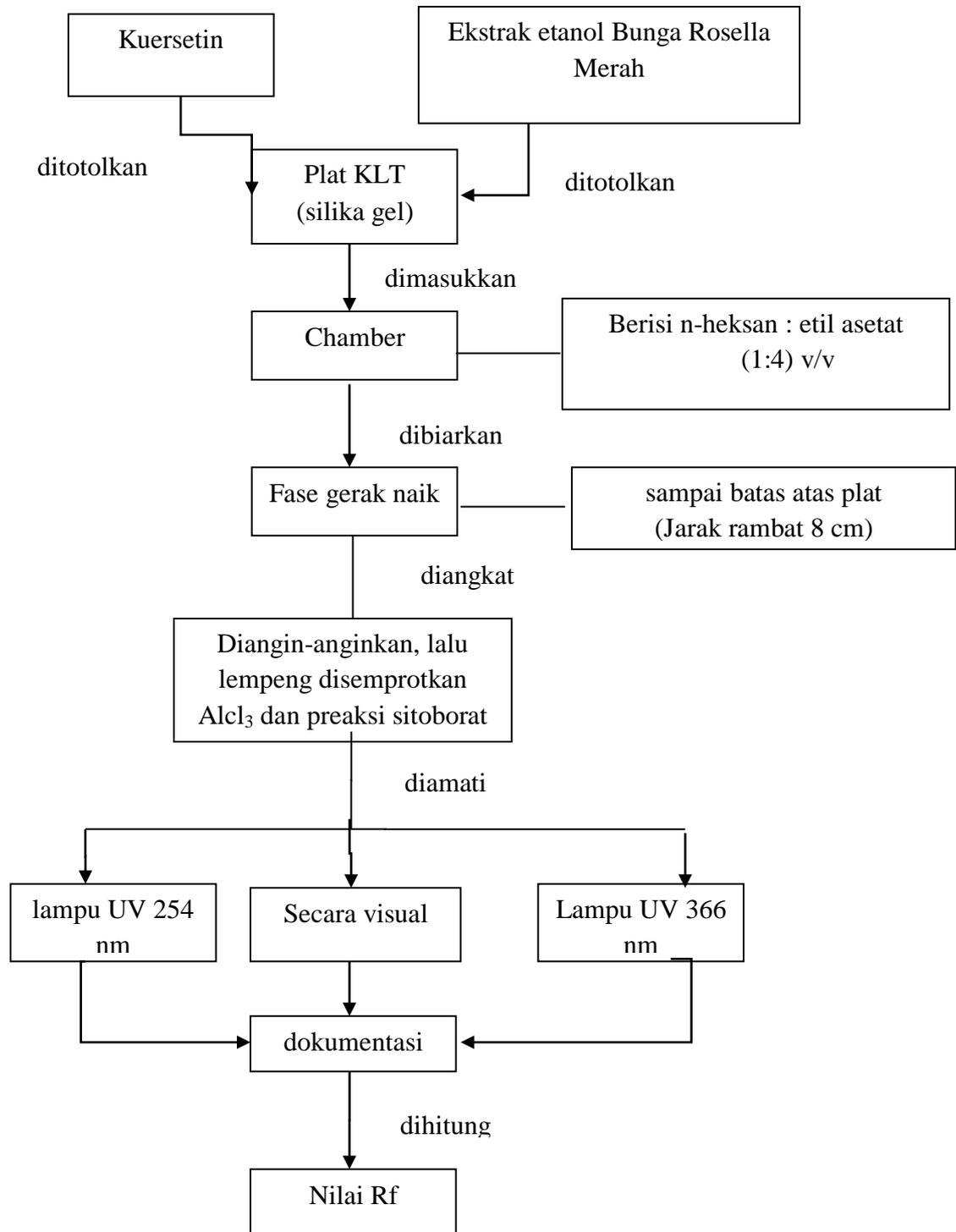
Bagan 3.2 Analisis Kualitatif Flavonoid Dengan Metode Reaksi Warna

3. Analisis Kualitatif Fenolik Dengan Metode Reaksi Warna



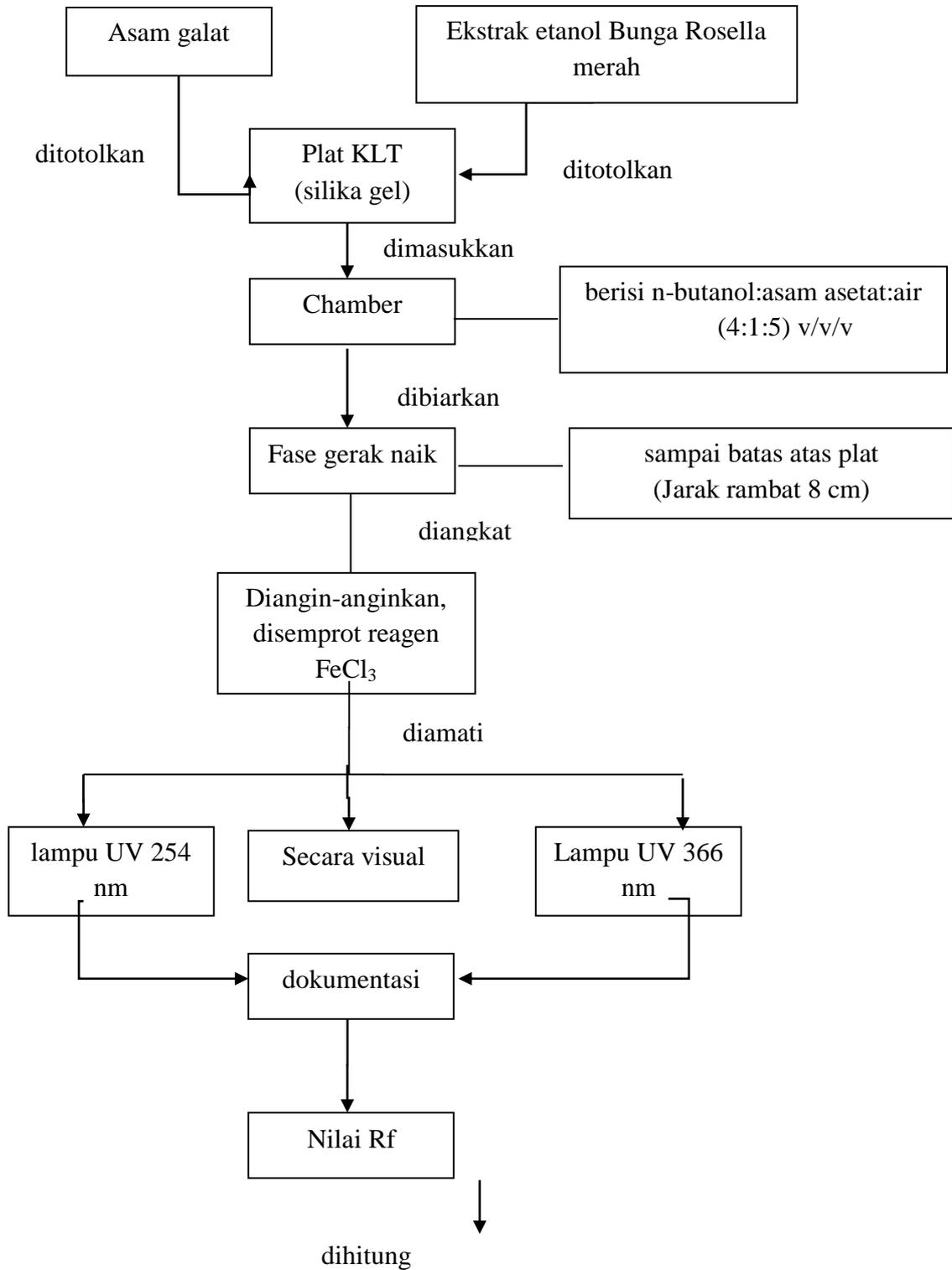
Bagan 3.3 Analisis Kualitatif Fenolik Dengan Metode Reaksi Warna

4. Analisis Kualitatif Flavonoid Dengan Kromatografi Lapis Tipis



Bagan 3.4 Analisis Kualitatif Flavonoid Dengan Kromatografi Lapis Tipis

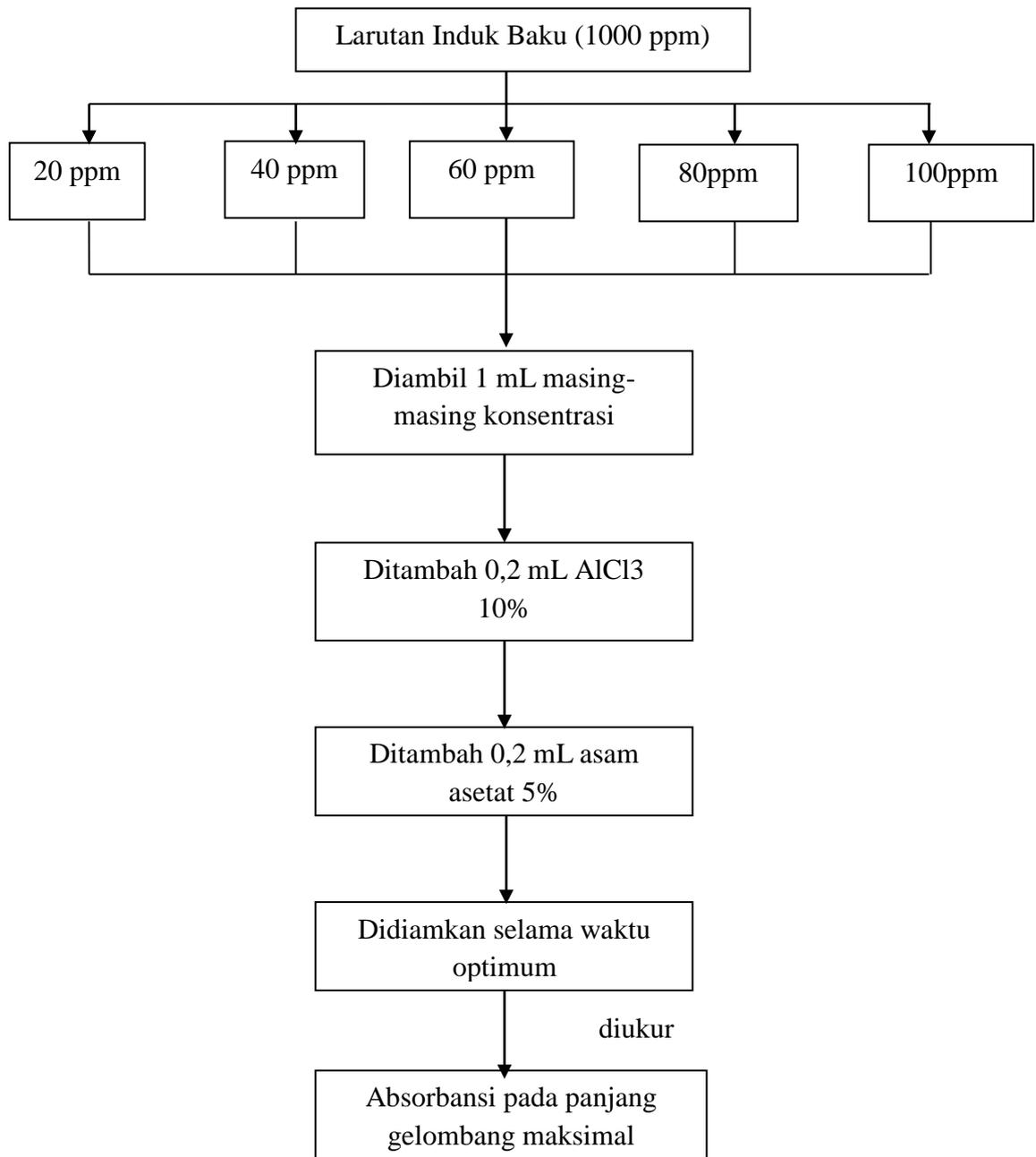
5. Analisis Kualitatif Fenolik Dengan Kromatografi Lapis Tipis



Bagan 3.5 Analisis Kualitatif Fenolik Dengan Kromatografi Lapis Tipis

6. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin Menggunakan Spektrofotometri

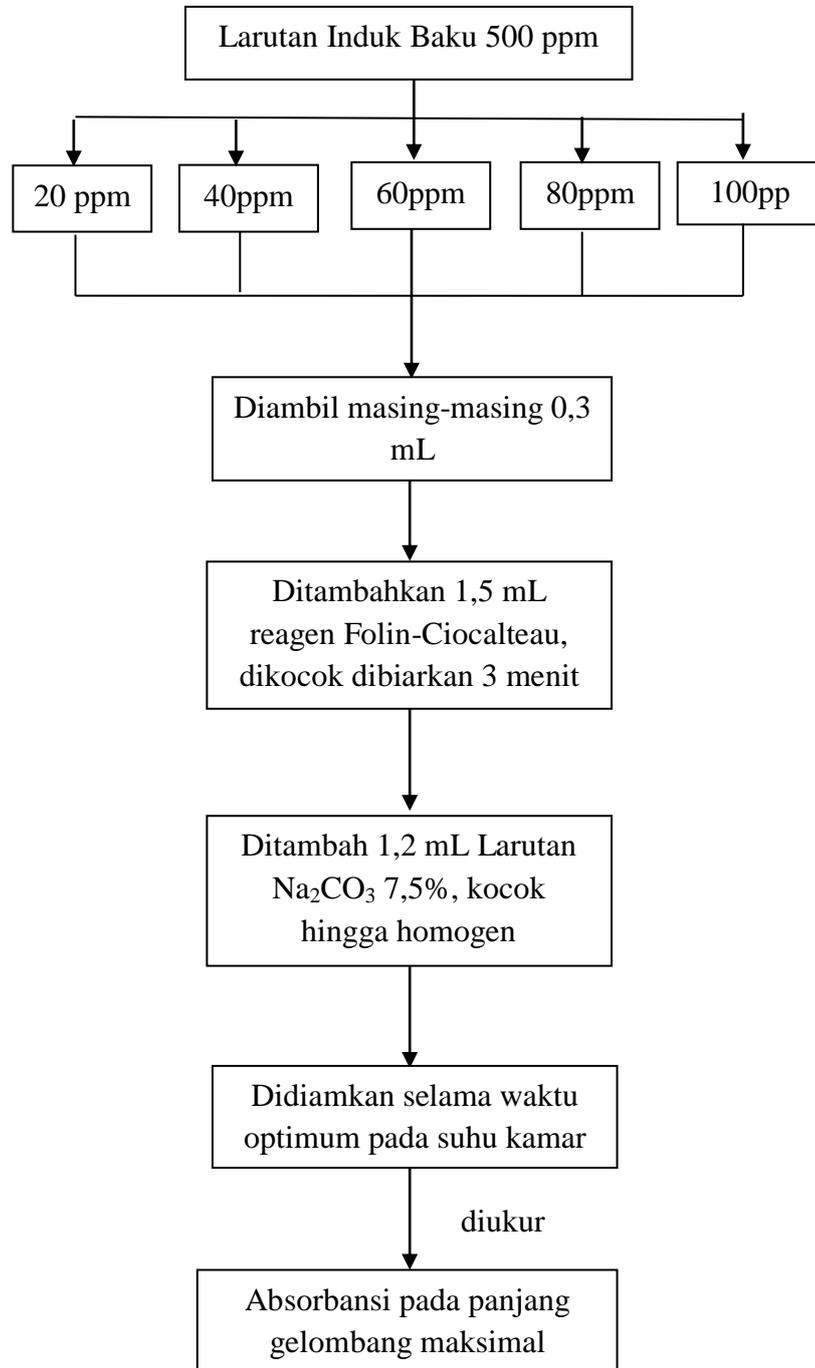
Uv-Vis.



Bagan 3.6 Penentuan Kurva Baku Kuersetin Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis.

7. Penentuan kurva baku asam galat menggunakan spektrofotometri

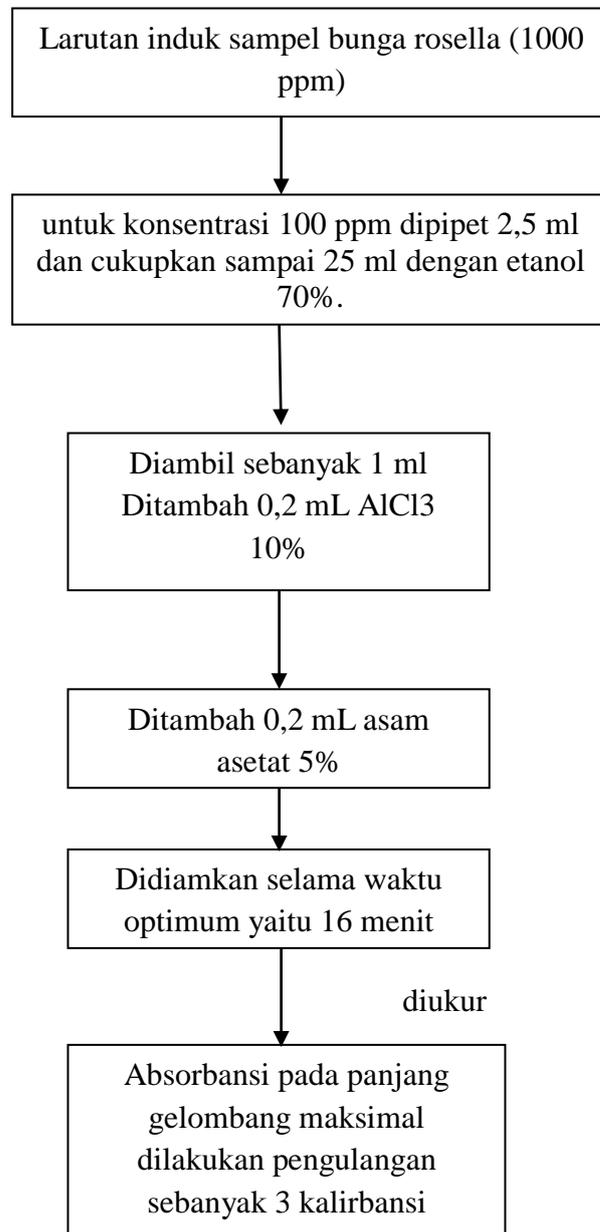
Uv-Vis



Bagan 3.7 penentuan kurva baku asam galat menggunakan spektrofotometri Uv-Vis

8. Analisis Kuantitatif Flavonoid Total Menggunakan Spektrofotometri

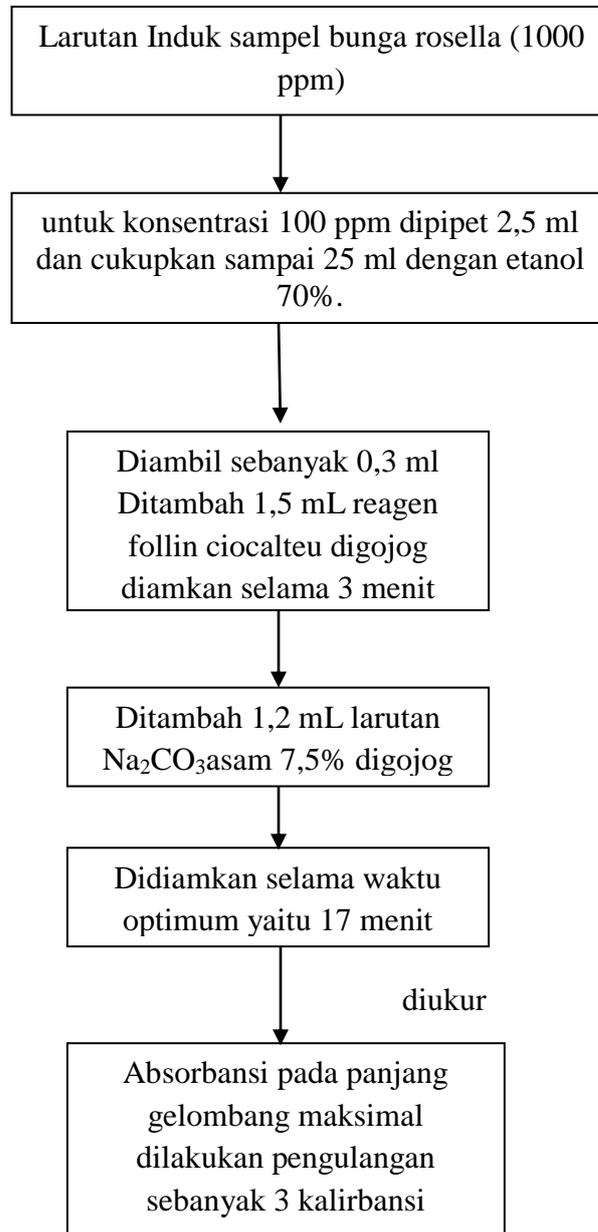
Uv-Vis



Bagan 3.8 Analisis Kuantitatif Flavonoid Total Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis

9. Analisis Kuantitatif Fenolik Total Menggunakan Spektrofotometri

Uv-Vis



Bagan 3.9 Analisis Kuantitatif Fenolik Total Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis