

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini termasuk dalam penelitian ekperimental murni yaitu untuk menganalisa kandungan flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak kasar kulit buah pisang raja (*Musa paradisiaca* var. Raja) bertujuan untuk menentukan kadar flavonoid total dan aktifitas antioksidan ekstrak kasar kulit buah pisang (*Musa paradisiaca* var. Raja). Sedangkan dalam menentukan kadar flavonoid total saya menggunakan metode kolorimetri yang dinyatakan absorban lalu hasilnya dimasukan ke dalam persamaan regresi dari kurva standar kuarsetin (mg/L) dengan absorbansi dan pada penelitian aktivitas antioksidan saya menggunakan metode FRAP (*ferric reducing antioxidant power*)

#### **B. Lokasi dan waktu penelitian**

##### 1. Lokasi penelitian

- a. Analisa kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan dilakukan dilaboraturium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran
- b. Determinasi dilakukan di Laboraturium Ekologi dan Biosistematik Universitas Diponegoro Semarang

##### 2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada November – Januari 2019

### **C. Subjek Penelitian**

Populasi penelitian ini adalah kulit buah pisang raja ( *Musa paradisiaca* var. Raja) yang diambil didaerah Ungaran Gedanganak Semarang Jawa Tengah dan sampel penelitian ini adalah ekstrak kulit buah pisang raja (*Musa paradisiaca* var. Raja)

### **D. Definisi Operasional**

1. Inhibition konsentrasi 50% ( $IC_{50}$ ) yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal FRAP sebanyak 50%. Sehingga dapat dicari menggunakan nilai  $IC_{50}$  untuk menentukan daya antioksidan yang dihitung menggunakan rumus persamaan regresi.
2. Kadar flavonoid total merupakan kadar flavonoid dalam sampel yang dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin (EQ). Kadar flavonoid total tersebut dihitung dari persamaan regresi linier kurva baku dengan memasukan data absorbansi.

### **E. Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada pada penelitian ini adalah konsentrasi dari ekstrak kulit buah pisang (*Musa paradisiaca* var. Raja) yang digunakan sebagai antioksidan yaitu sebesar 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm,40 ppm, dan 50 ppm.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi kulit buah pisang

### 3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah kandungan flavonoid, kadar total flavonoid dan  $IC_{50}$  ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi kulit buah pisang

## F. Pengumpulan Data

### 1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pisau , kain hitam , blender (philips), timbangan (sonic), gelas ukur (pyrex), beaker glass (iwaki) , labu takar (pyrex), kuvet (iwaki), cawan penguap (merck), ayakan no 80 mesh (merck), penangas air (merck), tabung reaksi (iwaki), pipet tetes (pyrex), pipet ukur (pyrex) dan Seperangkat alat ekstraksi meliputi : alat maserasi, penyaring, oven, serta spektrofotometer UV-Vis Shimadzu, dan satu set evaporator (*RE 100-Pro*),

### 2. Bahan

#### a. Bahan simplisia

Kulit buah pisang raja (*Musa paradisiaca* var. Raja)

#### b. Bahan kimia

Kalium Ferrisianida, etanol 96%, etanol.pa, dan aquadest (CV. Bratachem®) ,  $CaCl_2$  (merck), NaCl 10%, NaOH 0,5 N, asam trikloroasetat (TCA),  $FeCl_3$  0,1 % (Merck®), dapar fosfat, asam oksalat 1 %, Quersetin (Merck®).

## **G. Prosedur Penelitian**

### **1. Determinasi tanaman**

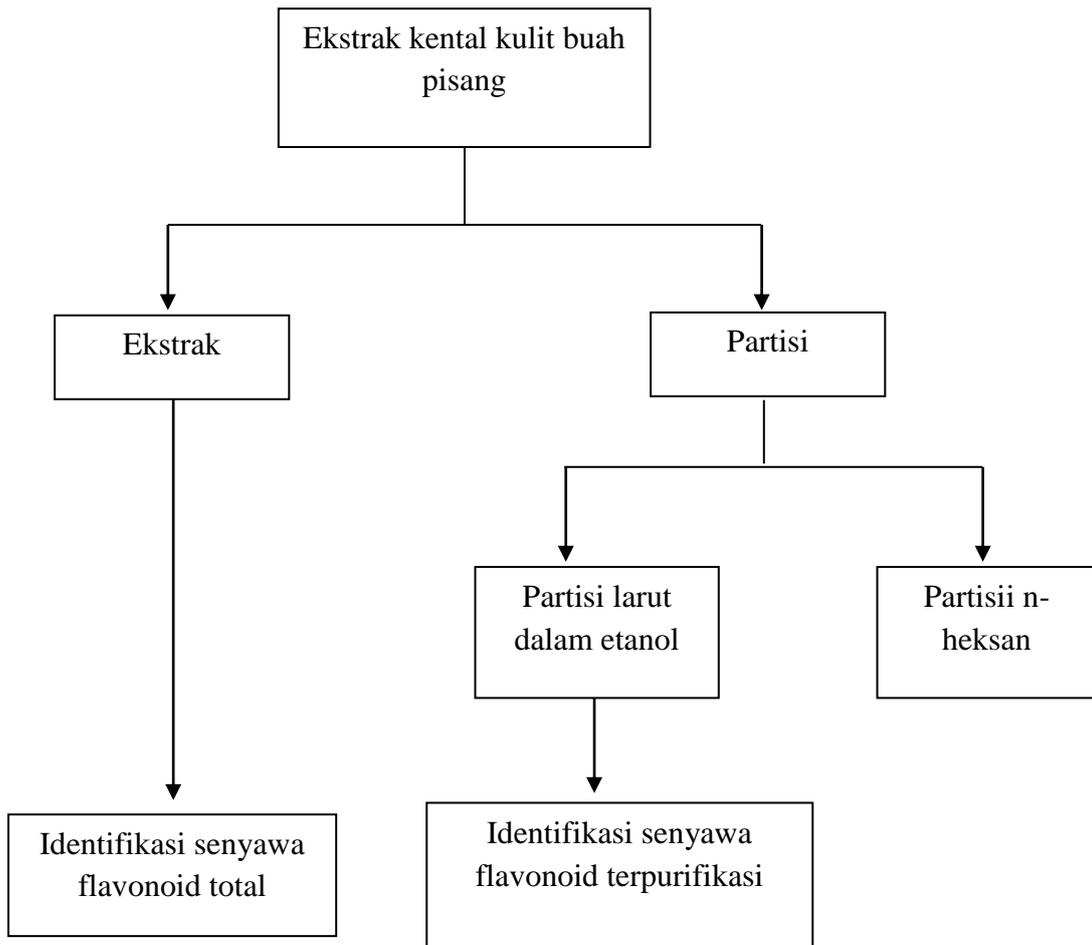
Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistematik Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang untuk mengetahui kebenaran dari kulit buah pisang raja (*Musa paradisiaca* var. Raja) yang akan digunakan dalam penelitian.

### **2. Pembuatan ekstrak kulit buah pisang**

Ekstak kulit buah pisang raja (*Musa paradisiaca* var. Raja) dibuat dengan metode maserasi dengan cara di timbang 300 gram serbuk kulit buah pisang. pelarut etanol p.a 96% ditambahkan sambil diaduk hingga seluruh serbuk kasar terbasahi merata dengan pelarut. Kemudian pelarut ditambahkan dengan perbandingan 1:10 yaitu 300 ml pelarut pertama 2250 ml sisanya 750 ml untuk remaserasi. Ekstraksi dilakukan selama satu jam dalam ruangan yang terlindung dari sinar matahari. Kemudian ekstrak yang diperoleh disaring menggunakan kain flanel. Setelah di lakukan penyarianan maserat pertama dilakukan remaserasi. Remaserasi menggunakan sisa dari pelarut etanol 750 ml kemudian maserat dipindah dalam pejanan tertutup dibiarkan ditempat sejuk dan terlindung dari sinar matahari selama 2 hari dengan dilakukan pengadukan sehari sekali. Maserat I dan maserat II dikumpulkan selanjutnya diuapkan dipenangas air pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian rendemen ekstrak di hitung dengan

Rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental (g)}}{\text{Bobot bahan sampel (g)}} \times 100\%$$



**Gambar 3.1 Skema Pembuatan Ekstrak kental etanol Kulit buah pisang (*Musa paradisiaca* var. Raja) dan ekstrak terpurifikasi**

### 3. Uji bebas etanol

Ekstrak ditambah dengan 2 tetes  $H_2SO_4$  pekat lalu ditambah dengan 1 ml  $CH_3COOH$  0,5 n lalu dipanaskan hasil negatif bila tidak tercium bau khas ester (Kuruniawati, 2015).

### 4. Identifikasi flavonoid

Identifikasi flavonoid dilakukan terhadap ekstrak etanol kulit buah pisang. Metode yang dilakukan dengan cara : sebanyak masing-masing 200 mg simplisia dan ekstrak ditambahkan 5 ml etanol dan di panaskan selamaa 5 menit didalam tabung reaksi, selanjutnya di tambahkan HCL pekat, kemudian ditambahkan 0,2 g serbuk Mg. Hasil positif adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua (magenta) dalam waktu 3 menit (sastrawan dkk.,dalam 2013).

### 5. Penentuan kadar flavonoid total

#### a. Penentuan panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{maks}$ ) kuersetin

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan cara membuat larutan induk kuersetin 1000  $\mu g/mL$  yaitu dengan menimbang kuersetin sebanyak 10,0 mg ditambahkan etanol pro analisis ke dalam labu ukur 10 mL (Januarti dan Wijayanti, 2018). Larutan induk 1000 ppm dipipet 1 mL dan dilarutkan dalam labu takar 10 mL menggunakan etanol p.a hingga batas (kadar kuersetin menjadi 100ppm). Sejumlah 0,5 mL larutan kuersetin 100 ppm direaksikan dengan 1,5 mL etanol 96%, 0,1 mL  $AlCl_3$  10%, 0,1 mL kalium asetat 1

M, dan 2,8 mL aquades. Kemudian dilakukan pembacaan pada rentang panjang gelombang 500 nm

b. Penentuan operating time kuersetin

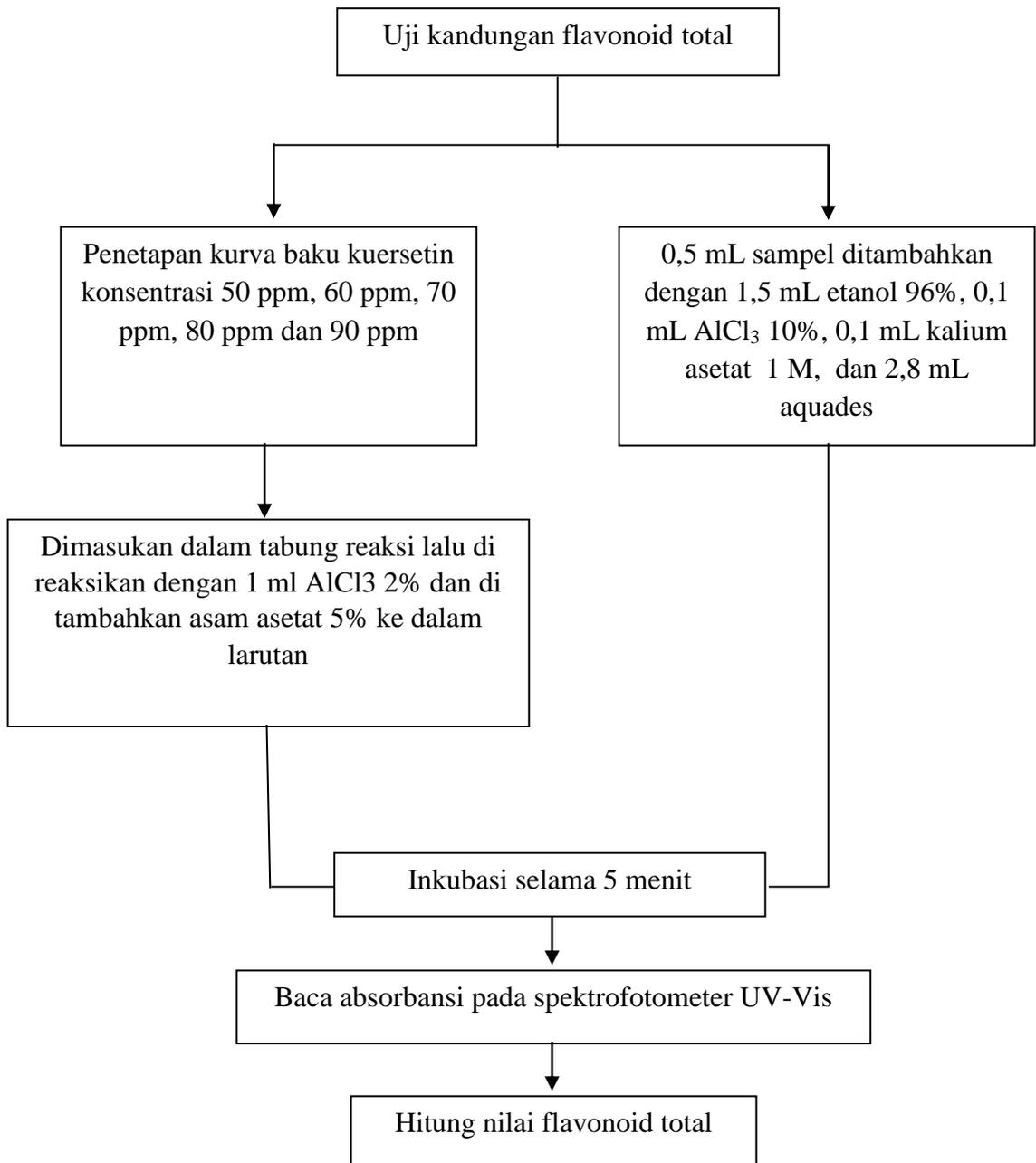
Penentuan operating time dilakukan dengan mengambil sebanyak 0,5 mL dari larutan kuersetin 100  $\mu\text{g/mL}$  kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu direaksikan dengan 1,5 mL etanol 96%; 0,1 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, 0,1 mL kalium asetat 1 M, dan 2,8 mL aquades. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit, sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Ipandi *et al.*, 2016)

c. Penentuan kurva baku kuersetin

Kurva baku dibuat menggunakan larutan induk dengan kadar 100 ppm dengan cara memipet larutan 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, dan 6 mL, masing-masing dilarutkan dalam labu takar 10 mL menggunakan pelarut etanol p.a. Lakukan pemipetan masing-masing sejumlah 0,5 ml ditambah dengan 1,5 mL etanol 96%, 0,1 ml aluminium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) 10%, 0,1 mL kalium asetat 1 M dan ditambahkan akuades 2,8 mL. Setelah itu diinkubasi selama operating time dan serapannya diukur pada  $\lambda$  maks yang diperoleh menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Kemudian dibuat kurva kalibrasi dengan menghubungkan nilai serapan sebagai koordinat (y) dan konsentrasi larutan standar sebagai absis (x) (Azizah *et al.*, 2014)

d. Penetapan kadar flavonoid total

Penetapan kadar flavonoid total ditentukan dengan metode kolorimetri oleh (Chang *et al.*, 2002) dalam Anwar dan Triyasmono (2016). Sebanyak 0,5 ml sampel ditambahkan dengan 1,5 ml etanol, 0,1 ml AlCl<sub>3</sub> 10% 0,1 ml kalium asetat 1 m, dan 2,8 ml aquades. Setelah diinkubasi selama 5 menit kemudian diukur absorbasinya pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 411,5 nm yang telah didapatkan dengan pembanding kuersetin ( $\lambda$  maks). Dilakukan 3 kali pengulangan.



**Gambar 3.2** Prosedur kerja flavonoid total ekstrak kasar kulit buah pisang

## 6. Pembuatan Stok FRAP

### a. Preaksi FRAP

#### 1) Larutan dapar fosfat 0,2 N pH 6,6

Larutan disiapkan dengan menimbang NaOH dan dilarutkan dengan aquades bebas  $CO_2$  hingga tepat 250 ml dalam labu takar. Kemudian sebanyak 6,8 gram  $KH_2PO_4$  yang dilarutkan dengan aquades bebas  $CO_2$  250 mL dalam lebu takar dan di campur 50 ml  $KH_2PO_4$  selanjutnya diukur sampai pH 6,6 dan dicukupkan dengan aquades  $CO_2$  hingga 200 mL.

#### 2) Larutan $FeCl_3$ 0,1 %

Larutan disiapkan dengan melakukan 0,1 gram  $FeCl_3$  dalam aquades dan diencerkan dalam labu takar 10 mL.

#### 3) Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10 %

Larutan disiapkan dengan melarutkan 0,1 gram  $FeCl_3$  dalam aquades dan diencerkan dalam labu takar 100 mL.

#### 4) Larutan kalium Ferrisianida 1 %

Timbang 1 gram kalium ferrisianida dan dilarutkan dengan air suling hingga 100 ml dalam labu.

#### 5) Pembuatan larutan standar asam askobat

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 50 mg asam askobat yang dilarutkan dengan asam askolat 1 % hingga tanda batas labu ukur 50 ml. Selanjutnya dari stok 1000 ppm diambil masing masing 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; dan ditempatkan pada labu

ukur 10 ml yang berbeda dan diencerkan dengan asam oksalat 1 % hingga 10 ml dan di homogenkan. Konsentrasi standar 1000 ppm asam askorbat yakni 10; 20; 30; 40; 50 (Mamat *et al.*, 2018).

b. Penetapan Panjang Gelombang ( $\lambda$ ) maksimum

Penentuan panjang gelombang Panjang gelombang maksimum diperoleh melalui pengukuran absorbansi dari larutan standar kuersetin pada konsentrasi 70 ppm. Sebanyak 1 mL larutan tersebut dicampurkan dengan 1 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6,6) dan 1 ml kallium ferrisianida 1 %, campuran diinkubasi pada 50°C selama 20 menit. Setelah selesai diinkubasi larutan ditambahkan 1 ml TCA, larutan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, Kemudian dimasukkan dalam labu takar 10 ml, tambahkan 1 ml aquades dan 0,5 ml FeCl<sub>3</sub>, cukupkan dengan asam oksalat hingga tanda batas, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 400-800 hingga diperoleh panjang gelombang maksimum (Magfira, 2018).

c. Pengukuran Serapan Blanko

Pengujian dilakukan dengan mencampur 50 $\mu$ l FRAP dengan etanol hingga mencapai volume 1,0 ml pada vial, selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400 nm. Semua pengerjaan dilakukan pada ruangan yang terhindar dari cahaya. Pengerjaan dilakukan sebanyak 3 replikasi.

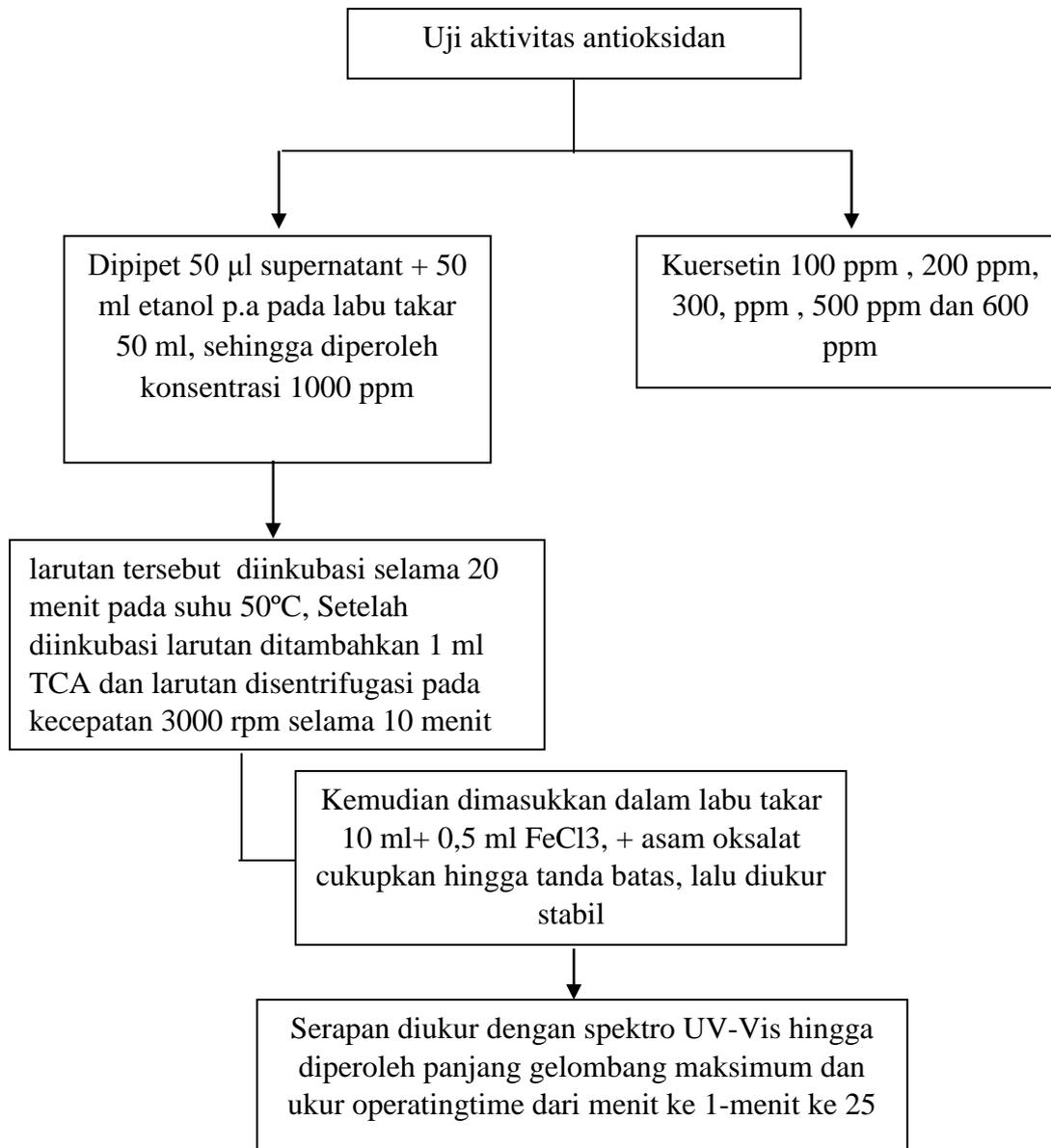
d. Pembuatan Kurva Baku

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 25 mg vitamin C yang dilarutkan dengan etanol 96% hingga batas labu ukur 25 ml. Selanjutnya dari larutan stok 1000 ppm diambil masing-masing 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mL ditempatkan dalam labu ukur 25 mL yang berbeda dan diencerkan dengan etanol 96% hingga 25 mL dan dihomogenkan, dipipet 1 mL, ditambahkan 1 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6,6) dan 1 mL ( $K_3Fe(CN)_6$  1% setelah itu diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50 °C. Ditambahkan 1 mL aquades dan 0,5 mL  $FeCl_3$  0,1% setelah itu diinkubasi dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 705 nm pada spektrofotometer UV-Vis. Konsentrasi standar 1000 ppm asam askorbat yakni 10; 20; 30;40; 50 (Mamat et al.,2018)

e. Pengujian antioksidan Metode FRAP

Diambil 50  $\mu$ l ekstrak kulit buah pisang dan dilarutkan dalam 50 ml etanol p.a pada labu takar 50 ml hingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dipipet masing-masing 20  $\mu$ l , 40  $\mu$ l , 60  $\mu$ l, 80  $\mu$ l, dan 100  $\mu$ l dari larutan stok kedalam tabung reaksi hingga konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm selanjutnya ditambahkan masing-masing 1 ml dapar fosfat 0,2 N (pH 6,6) dan 1 ml  $K_3Fe(CN)_6$  1%. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 ml larutan TCA 10% lalu

disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifuge dipipet dimasukkan kedalam labu takar 10 ml, dan tambahkan 0,5 ml  $FeCl_3$  0,1 % kemudian add kan aquadest hingga tanda batas. Lalu diukur serapan dengan panjang gelombang maksimumnya. Pengerjaan dilakukan ditempat gelap.



**Gambar 3.3** Prosedur Kerja Pengujian Aktivitas Antioksidan

## H. Analisis Data

Kadar flavonoid total dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi sampel pada panjang gelombang 500 nm dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Nilai absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan garis linear  $y = bx + a$  yang diperoleh dari kurva standar kuersetin. Kurva standar diperoleh dari hubungan antara konsentrasi kuersetin (mg/L) dengan absorbansi. Hasil dinyatakan dalam satuan mg ekivalen kuersetin dengan cara membuat persamaan dalam jumlah mg/L sampel yang digunakan dengan kesetaraan kuersetin tiap gram dan dinyatakan dalam satuan mgQE/g sampel

Untuk aktivitas antioksidan dinyatakan dengan inhibisi concentum 50% atau  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi sampel yang dapat merendam radikal bebas. Setelah di dapatkan persentase inhibi dari masing masing konsentrasi di lanjutkan dengan perhitungan secara regenerasi linier (x,y) untuk mendapatkan nilai IC dimana x sebagai konsentrasi  $\mu\text{g/ml}$  dan y sebagai persentasi aktivitas. Sedangkan IC sampel dan pembanding diperoleh dengan rumus :

$$Y = Bx + A$$

Nilai  $IC_{50}$  di dapatkan dari x setelah mengganti y dengan 50, Nilai  $IC_{50}$  yang semakin kecil, menunjukkan semakin tinggi daya antioksidan dari sampel tersebut (Magfira, 2018)