

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Dalam penelitian ini *desain* yang digunakan adalah penelitian *eksperimental laboratorium*. Tahap penelitian dimulai dengan ekstraksi Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) menggunakan metode ekstraksi maserasi, kemudian dilanjutkan tahap kedua yaitu skrining fitokimia metabolit sekunder Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) menggunakan metode reaksi warna. Tahap selanjutnya adalah analisis antioksidan menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis, yang didukung dengan literatur dan pustaka yang sesuai dengan judul. Pada pengujian antioksidan bunga rosella dilakukan tiga kali replikasi.

#### **B. Lokasi Penelitian**

1. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2019

2. Lokasi penelitian

Laboratorium Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

3. Determinasi Tumbuhan.

Determinasi bahan dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

#### **C. Subjek Penelitian**

Populasi dalam penelitian ini adalah bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) yang diambil dari Kecamatan Bawen Kabupaten Semarang Jawa Tengah.

Sedangkan sampel dari penelitian ini adalah ekstrak bunga rosella (*Hisbiscus sabdariffa* L).

#### **D. Variabel Penelitian.**

##### 1. Variabel Bebas (Variabel independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% dan 96% bunga rosella (*Hisbiscus sabdariffa* L) yang digunakan sebagai antioksidan dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm

##### 2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% dan 96% bunga rosella (*Hisbiscus sabdariffa* L) dengan menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*) dilihat dari nilai  $IC_{50}$

##### 3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah proses ekstraksi dan metode uji antioksidan.

#### **E. Alat dan Bahan Penelitian**

##### 1. Alat penelitian

Seperangkat alat Maserasi, Blender (*waring*) MX-HGCSS Model HGB150 PT.SAKA, Batang pengaduk, Beaker gelas *Pyrex*, Penangas air *ex RRC*, *Chamber TLC Duran*, *Aquades*, *Waterbath Memmerth WNB14*, Spektropotometer (Uv-Vis) DR3900 *Hach*, Ayakan 80 mesh *Sieve*, Timbang analitik *Matrix*, *Rotary ovaporator IKA*, Pipet tetes, Pipet mikro *Scilogex*, Labu ukur *Pyrex*, Tabung reaksi *IWAKI*.

## 2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan ekstrak etanol 70% dan 96% bunga rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L) yang sebelumnya dideterminasi di Laboratorium Biologi-MIPA Universitas Diponegoro, etanol 70% dan 96%, HCl 2 M, FeCl<sub>3</sub> 1%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, serbuk DPPH, vitamin C, etanol p.a

## F. Prosedur Penelitian

### 1. Penyiapan sampel bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L).

Sampel yang digunakan adalah bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) berwarna merah dengan karakteristik tidak layu, kelopak bunga segar, berwarna merah pekat yang di panen dari kecamatan bawen kabupaten semarang. Bunga rosella yang baru saja dipetik/dipanen dilakukan sortasi basah dan dirajang menggunakan pisau. Setelah itu dicuci dibawah air mengalir lalu ditiriskan, kemudian dijemur di bawah sinar matahari tidak langsung dengan cara menutup bunga rosella menggunakan kain tipis berwarna hitam. Setelah kering bunga rosella dilakukan sortasi kering dan setelah itu diserbuk menggunakan blender hingga halus, lalu di ayak menggunakan mesh ukuran 80, lalu disimpan dalam wadah bertutup kedap agar tidak menyerap air atau menjadi lembab (Windyaswari, 2018).

### 2. Pembuatan ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L).

Ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) dibuat dengan metode maserasi dengan cara ditimbang 500 gram serbuk simplisia diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dan etanol 70% sebanyak 2500 ml dengan sesekali dilakukan pengadukan selama 2 hari. Setelah proses ekstraksi

dilakukan penyaringan dengan kain flanel untuk memisahkan filtrat dan residu. Residu hasil maserasi dilakukan remaserasi lagi dengan etanol 70% dan 96% sebanyak 1250 ml selama 1 hari. Filtrat hasil maserasi dan remaserasi digabungkan. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C hingga mendapat ekstrak kental (Windyaswari, 2018). Hasil rendemen ekstrak bunga rosella dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot total ekstrak}}{\text{Bobot total serbuk}} \times 100\%$$

3. Uji skrining ekstrak bunga rosella (*Hisbiscus sabdariffa* L).

Uji skrining dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etanol bunga rosella. Uji yang dilakukan antara lain uji tanin, saponin dan flavonoid (Pratiwi, 2014).

a. Senyawa flavonoid

Sebanyak 0,1 gram ekstrak dilarutkan dengan etanol 96% sampai terlarut, lalu ditambahkan pereaksi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Jika terjadi warna merah, kuning atau jingga menunjukkan adanya flavonoid.

b. Senyawa saponin.

Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan 10 ml air panas dan dididihkan selama 10 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi tertutup kemudian dikocok selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit, ditambah 1 ml HCL 2 M. adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.

c. Senyawa tanin.

0,1 gram sampel diberi penambahan 10 ml air panas dan dididihkan selama 10 menit. Kemudian saring ekstrak, filtrat ditambahkan 10 ml  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif menunjukkan warna biru-hijau kehitaman.

4. Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (*1,1 Diphenyl-2-picrylhydrazyl*).

**a. Pembuatan DPPH 0,4 mM**

1) Perhitungan serbuk DPPH

Molaritas DPPH yang dibutuhkan  $0,4 \text{ mM} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

BM DPPH = 394,32 g/mol

Volume larutan = 100 ml = 0,1 liter

Penimbangan DPPH = BM DPPH x Vol larutan x Molaritas DPPH

=  $394,32 \text{ g/mol} \times 0,1 \text{ L} \times 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

=  $15,8 \times 10^{-3} \text{ g}$

= 15,8 mg

2) Pembuatan larutan DPPH 0,4

Ditimbang seksama serbuk DPPH sebanyak 15,8 mg, dimasukkan dalam labu takar 100 ml, dilarutkan dengan etanol p.a sampai tepat 100 ml. Gojog sampai homogen sehingga didapatkan konsentrasi 0,4 mM (Prasditya, 2017).

## **b. Pengujian DPPH**

### 1) Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Sebanyak 2 ml larutan DPPH 0,4 mM ditambahkan dengan 8 ml etanol p.a sampai batas pada labu ukur 10 ml kemudian didiamkan selama menit tertentu ditempat yang gelap, absorbansi diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 450-550 nm untuk mendapatkan absorbansi  $\pm 0,2 - 0,8$ . Panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi paling besar merupakan panjang gelombang maksimal (Molyneux, 2004).

### 2) Penentuan *operating time* DPPH

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara 2 ml larutan DPPH ditambahkan dengan larutan standar vitamin C 20 ppm. Larutan tersebut dibaca absorbansinya pada panjang gelombang yang diperoleh dengan interval waktu 1 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Bakti *et al.*, 2017).

## **c. Penentuan aktivitas antioksidan vitamin C sebagai pembanding.**

Vitamin C sebanyak 25 mg kemudian dilarutkan dalam etanol p.a 25 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm (Syarifuddin, 2015). Larutan vitamin C 1000 ppm dibuat dengan konsentrasi 1, 5, 10, 15, dan 20 ppm (Pasilala, 2016). Sebanyak 1 ml larutan standar DPPH ditambah dengan larutan konsentrasi vitamin C sampai tanda batas menggunakan mikro pipet pada labu ukur 5 ml, kemudian didiamkan ditempat gelap

selama *operating time* yang diperoleh. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimum yang di peroleh (Prasditya, 2017).

#### **d. Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak bunga rosella**

Ekstrak etanol 70% dan etanol 96% bunga rosella sebanyak 20 mg dilarutkan dalam etanol p.a 20 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm (Prasditya, 2017). Larutan ekstrak 1000 ppm dibuat konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm (Vivin Nopiyanti, Reslely Harjanti, 2016). Dari masing-masing konsentrasi ditambahkan sebanyak 1 ml larutan DPPH dalam labu takar 5 ml. Larutan didiamkan di tempat gelap selama *operating time* yang diperoleh. Larutan dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Prasditya, 2017).

#### **e. Penentuan nilai IC<sub>50</sub>**

Penentuan aktifitas antioksidan dinyatakan dengan *inhibisi concentration* 50% atau IC<sub>50</sub> yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Untuk mendapatkan nilai aktifitas antioksidan yang pertama adalah dengan menghitung nilai % inhibisi. Aktifitas penangkal radikal bebas di ekspresikan sebagai persen inhibisi yang dapat di hitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{Absorban kontrol} - \text{Absorban bahan uji})}{\text{Absorban kontrol}} \times 100 \%$$

Keterangan :

Absorban kontrol : Absorbansi DPPH

Absorban bahan uji : Absorbansi ekstrak bunga rosella dan vitamin

(Ghosal& Mandal, 2012)

Setelah didapatkan nilai inhibisi maka selanjutnya nilai persentase inhibisi diplot dibuat regresi linier untuk di dapatkan nilai sumbu x dan sumbu y. Persamaan yang didapatkan kemudian di masukan kedalam rumus untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub>. Persamaan tersebut dapat di hitung dengan rumus berikut :

$$y = bx + a$$

Dimana nilai y adalah penghambatan 50%, maka nilai y di masukan angka 50.

#### **G. Analisa Data**

Analisis data pada penelitian ini adalah untuk menentukan perbandingan nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol 96% dan 70% dengan nilai IC<sub>50</sub> vitamin C. Hasil dari penelitian kemudian akan dianalisis menggunakan uji anova. Dalam penelitian akan di dapatkan rata-rata nilai IC<sub>50</sub> yang selanjutnya akan dibuat grafik dan tabel untuk mentukan nilai perbandingan dari IC<sub>50</sub> ekstrak etanol 96% dan 70% bunga rosella dengan nilai IC<sub>50</sub> vitamin C.