

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Skripsi

Dilakukan penelitian kuantitatif secara eksperimental untuk mengetahui uji peredaman antioksidan dari ekstrak etanol daun rosella (*H. sabdariffa* L.). Metode yang digunakan yaitu FRAP dengan parameter FRAP *value* dan Vitamin C sebagai larutan pembanding.

B. Lokasi dan Waktu

Pengujian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Dilakukan pada bulan April 2022 – Juni 2022.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi penelitian ini yaitu daun rosella (*H. sabdariffa* L.) yang didapatkan dari perkebunan di Desa Majaksingi, Kecamatan Borobudur, Kabupaten Magelang Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel penelitian yang digunakan ialah daun yang berwarna hijau muda, dengan lebar 5-8 cm dan panjang 6-15 cm, diambil pada bagian ke-2 sampai 4 dari pucuk tanaman, dipetik pada pagi hari saat daun masih segar (Oktaviani *et al.*, 2018).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas ialah konsentrasi ekstrak etanol daun rosella (*H. sabdariffa* L).
2. Variabel terikat ialah aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol daun rosella (*H. sabdariffa* L) yang dinyatakan sebagai nilai FRAP *value*.
3. Variabel pengacau terkendali ialah waktu pemetikan, dan tempat tumbuh tanaman.

4. Variabel pengacau tak terkendali ialah ialah cuaca lingkungan, dan suhu kelembapan.

E. Definisi Operasional

1. Daun Rosella didapatkan dari perkebunan warga di Desa Majaksingi, Kecamatan Borobudur, Kabupaten Magelang Jawa Tengah.
2. Waktu pemetikan dalam penelitian ini adalah pada pagi hari saat daun masih segar.
3. Bagian yang akan diambil daun yang berwarna hijau muda, dengan lebarnya 5-8 cm dan panjang 6-15 cm, diambil pada bagian ke-2 sampai 4 dari pucuk tanaman.
4. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%.
5. Antioksidan adalah senyawa yang bisa mendonorkan proton terhadap senyawa radikal bebas, sampai mengakibatkan terjadinya reaksi lebih lanjut yang berbahaya.
6. Parameter antioksidan yang digunakan adalah FRAP *value*

F. Alat dan Bahan

1. Alat: grinder, beaker glass (*Iwaki*), erlenmeyer (*Iwaki*), propipet, batang pengaduk, rak tabung reaksi, timbangan analitik (*Ohaus*), pipet tetes, mikropipet, pipet ukur (*Iwaki*), lemari asam, labu ukur (*Iwaki*), cawan porselin, vortex (*Ohaus*), ayakan 40 mesh, sendok spatula, toples kaca, Spektrofotometer UV-Vis *Double Beam* (*Genesys 10S UV-Vis*), wajan, kompor, oven (Mettler type UN-160), bejana, dan lampu UV *Viewing Cabinet* 254 nm dan 366 nm (UvOC-02).
2. Bahan: daun rosella (*H. sabdariffa* L.), etanol 70%, aquades, Vitamin C, TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), kertas saring, *blue tip*, *white tip*, ferro sulfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), asam klorida pekat (HCl), aluminium klorida, metanol, serbuk magnesium, klorida heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), natrium asetat, asam asetat, plat *silica gel* GF₂₅₄, kloroform, FeCl_3 , kuersetin, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorff, asam sulfat, dan aluminium foil.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tanaman rosella diambil dari perkebunan warga di Desa Majaksingi, Kecamatan Borobudur, Kabupaten Magelang Jawa Tengah pada pagi hari jam 06.30 - 08.05. Kriteria tanaman rosella yang diambil untuk dilakukan determinasi yaitu pada usia panen tanaman 7-8 bulan, daun yang berwarna hijau muda dengan lebar 5-8 cm dan panjang 6-15 cm, diambil pada bagian ke-2 sampai 4 dari pucuk tanaman. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas dari tanaman yang akan diteliti (Diniatik, 2015).

2. Pembuatan sampel

Daun rosella sebanyak \pm 3 kg dibersihkan menggunakan air mengalir agar terhindar dari kotoran (tanah) yang melekat pada daun, kemudian dilakukan perajangan untuk mempercepat proses pengeringan, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C hingga menjadi simplisia kering. Tujuannya untuk menguapkan air yang berada dalam bahan, karena kandungan air pada simplisia sangat mempengaruhi kualitas, semakin rendah kandungan kadar air pada simplisia semakin tinggi rendemen yang dihasilkan (Huriawati *et al.*, 2016). Setelah kering (rapuh saat digenggam) kemudian dihaluskan menggunakan grinder hal ini dilakukan untuk mempermudah pengestrakan (Husni *et al.*, 2018). Tujuan dihaluskan karena serbuk simplisia yang semakin halus menyebabkan luas permukaan serbuk semakin besar, sehingga kontak antara serbuk dan pelarut juga semakin besar. Simplisia diayak dengan ayakan 40 mesh untuk mendapatkan derajat halus serbuk yang diinginkan. Digunakan ayakan 40 mesh karena akan lebih mudah kontak dengan pelarut, kontak simplisia dengan pelarut akan memberi kesempatan yang lebih besar

dalam pengekstrakan (Amaliah *et al.*, 2019). Lalu serbuk simplisia daun rosella disimpan dalam toples kaca (Windyaswari *et al.*, 2018).

3. Pembuatan ekstrak etanol

Serbuk simplisia daun rosella sebanyak 500 g ditimbang lalu dimasukkan pada toples kaca. Maserasi dengan etanol 70% menggunakan perbandingan (1:10) yaitu 500 g serbuk simplisia : 5 L pelarut etanol 70%. Pemilihan etanol 70% sebagai pelarut dikarenakan etanol 70% ialah pelarut yang lebih polar dari etanol 96%, sehingga senyawa flavonoid yang polar lebih larut dalam etanol 70% (Riwanti *et al.*, 2020). Toples kaca ditutup dan disimpan ditempat yang gelap supaya senyawa dalam toples kaca tidak rusak. Sampel dimaserasi selama 3 hari dan setiap 12 jam sekali lakukan pengadukan untuk meratakan distribusi cairan penyari sehingga konsentrasi akan tetap terjaga (Handoyo, 2020). Filtrat disaring lalu diremaserasi residunya satu kali menggunakan etanol 70% sebanyak 2,5 L. Tujuan diremaserasi yaitu untuk memaksimalkan proses ekstraksi yang sudah dilakukan (Anjaswati *et al.*, 2021). Hasil ekstraksi dipekatkan untuk mendapatkan ekstrak kental menggunakan kompor listrik, setelah itu dihitung rendemen ekstrak (Nahor *et al.*, 2020).

$$\%Rendemen = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$

4. Uji Organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan dengan pengamatan secara visual, antara lain bentuk, bau, rasa serta warna (Rahmatullah *et al.*, 2019).

5. Skrining fitokimia

a. Flavonoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol daun rosella ditambahkan dengan HCl pekat sebanyak 1 mL dan 0,05 mg serbuk magnesium, kemudian dikocok. uji positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi merah (Theodora *et al.*, 2019).

b. Alkaloid

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol daun rosella dilarutkan 10 mL H_2SO_4 2N yang sudah dipanaskan, kemudian disaring dan bagi menjadi 3 bagian, dan masukkan 5 tetes kedalam masing-masing tabung reaksi. Kemudian tambahkan reagen Mayer, Wagner, dan Dragendorff tetes demi tetes ke masing-masing tabung. Uji Mayer positif alkaloid apabila terbentuk endapan putih, uji Wagner positif alkaloid apabila terbentuk endapan coklat, dan uji Dragendorff positif alkaloid apabila terbentuk endapan jingga. Jika hasil uji positif 2-3 maka sampel mengandung alkaloid (Aprilia *et al.*, 2015).

c. Tanin

Dimasukkan ekstrak etanol daun rosella sebanyak 0,1 g, dimasukkan dalam tabung reaksi lalu larutkan dalam 5 mL air panas. Ditambahkan larutan $FeCl_3$ 3 tetes. Uji tanin dinyatakan positif jika terbentuk warna kehijauan atau biru tua (Munandika *et al.*, 2021).

d. Saponin

Dimasukkan 0,1 g sampel ekstrak etanol daun rosella kedalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 10 mL air panas, didiamkan lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Bila membentuk busa setinggi 1-10 cm kemudian tambahkan 2 tetes HCl dan diamkan ± 10 menit, bila busa tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Munandika *et al.*, 2021).

6. Identifikasi senyawa flavonoid dengan kromatografi lapis tipis

1) Orientasi Fase gerak

Penentuan fase gerak dilakukan dengan cara orientasi.

Dapat dilihat pada (Tabel 2):

Tabel 2. Orientasi Fase Gerak

No	Fase Gerak	Perbandingan	Literatur
1	Toluene:Aseton:Asam Format	(4:4:2)	(Annegowda <i>et al.</i> , 2012)
2	Toluene:Aseton:Asam Format	(6:6:3)	(Annegowda <i>et al.</i> , 2012) dengan modifikasi volume.
3	Toluene:Aseton:Asam Format	(8:8:4)	(Annegowda <i>et al.</i> , 2012) dengan modifikasi volume.
4	Kloroform:Metanol:Asam asetat	(9:1:0,5)	(Theodora <i>et al.</i> , 2019)
5	Kloroform:Metanol:Asam asetat	(14:2:1)	(Theodora <i>et al.</i> , 2019) dengan modifikasi volume.

Berdasarkan orientasi fase gerak yang telah dilakukan pada (Tabel 2), pada penelitian ini digunakan fase gerak Kloroform: Metanol: Asam asetat (14:2:1) karena fase gerak tersebut memberikan hasil yang optimal.

2) Penjenuhan bejana

Fase gerak Kloroform: Metanol: Asam asetat (14:2:1) dimasukkan kedalam bejana dan dijenuhkan. Kemudian dimasukkan kertas saring dengan tinggi 18 cm kedalam bejana. Setelah itu ditutup kedap dan didiamkan hingga fase gerak tersebut jenuh. Fase gerak jenuh dilihat dari kertas saring yang terbasahi oleh fase gerak (Annegowda *et al.*, 2012).

3) Pembuatan larutan standar kuersetin 1000 ppm

Ditimbang baku standar kuersetin sebanyak 2 mg, lalu dilarutkan dengan etanol p.a sampai dengan 2 mL (Asmorowati *et al.*, 2019).

4) Pembuatan larutan uji 100 ppm

Ditimbang ekstrak etanol daun rosella sebanyak 0,5 mg, kemudian dilarutkan dalam 5 mL etanol p.a (Asmorowati *et al.*, 2019).

5) Prosedur KLT

Plat silika selebar 10x4 cm, lalu diberi penanda atas dan bawah (1 cm). Kemudian dipanaskan di oven ± 30 menit dengan suhu 110°C. Tujuannya agar kandungan air pada plat tersebut berkurang. Ditotolkan sampel ekstrak daun rosella dengan konsentrasi 100 ppm dan standar kuersetin dengan konsentrasi 1000 ppm pada garis bawah dengan *white tip*. masukkan dalam bejana yang telah jenuh, plat KLT dibiarkan di dalam bejana hingga eluen sampai pada tanda batas yang sudah ditentukan. Kemudian plat KLT dikeluarkan dari bejana lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan kemudian disinari di bawah lampu ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Kemudian disemprotkan $AlCl_3$ sebagai penampak bercak dan diamati kembali. Rf dihitung menggunakan rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh zat yang diteliti}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Nilai Rf menunjukkan pemisahan cukup baik adalah berkisar 0,2 - 0,8 (T. M. Dewi *et al.*, 2015).

7. Uji aktivitas antioksidan dengan Metode FRAP

a. Pembuatan larutan Buffer Asetat pH 3,6

Natrium Asetat ditimbang sebanyak 3,7 mL dengan asam asetat pekat 46,3 mL dan larutkan aquades pada labu takar 100 mL (Safitri *et al.*, 2020).

b. Pembuatan larutan TPTZ (2,4,6-tripyridil-s-triazine)

Ditimbang TPTZ sebanyak 31 mg dimasukkan dalam labu takar 10 mL, kemudian ditambahkan HCl 40 mmol/L hingga 10 mL (Safitri *et al.*, 2020).

c. Pembuatan Larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Ditimbang $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,27 g, kemudian tambahkan aquades pada labu takar hingga 50 mL. Setelah itu, larutkan hingga homogen (Safitri *et al.*, 2020).

d. Pembuatan reagen FRAP

Dibuat reagen FRAP dengan perbandingan (10:1:1) dengan cara mencampurkan sebanyak 25 mL buffer asetat, larutan TPTZ sebanyak 2,5 mL dan 2,5 mL larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ kemudian dihomogenkan, tambahkan aquades pada labu takar 100 mL (Safitri *et al.*, 2020).

e. Pembuatan larutan Standar $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Sebanyak 10 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan aquades pada labu takar 10 mL sampai diperoleh konsentrasi sebesar 1000 ppm. Kemudian dilakukan orientasi dalam 5 seri konsentrasi yaitu 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, 1000 ppm. Pada konsentrasi tersebut didapatkan nilai absorbansi yang tinggi sekitar 1,0, sehingga digunakan konsentrasi 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm. Kemudian dimasukkan dalam labu takar 5 mL dan di tambahkan dengan aquades hingga tanda batas (Safitri *et al.*, 2020).

f. Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ diambil 1 mL dengan konsentrasi yang paling tinggi 1000 ppm, lalu ditambahkan 3 mL reagen FRAP, kemudian dibaca pada rentang panjang gelombang 588-610 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Safitri *et al.*, 2020).

g. Penentuan *operating time*

Di ambil larutan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1 mL dengan konsentrasi yang paling tinggi 1000 ppm, tambahkan 3 mL reagen FRAP, setelah itu, dibaca absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dengan selang waktu 5

menit untuk mendapatkan absorbansi yang stabil (Samosir *et al.*, 2012)

h. Pembuatan dan pengujian larutan pembanding vitamin C

Ditimbang Vitamin C 1 mg, dilarutkan dengan etanol dalam labu takar 10 mL hingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Kemudian dilakukan orientasi dalam 5 seri konsentrasi yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm. Pada konsentrasi tersebut didapatkan nilai absorbansi yang tidak stabil, sehingga digunakan konsentrasi 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm dan 50 ppm dan tambahkan etanol pada masing-masing larutan hingga tanda batas labu ukur 10 mL. Setelah itu, di ambil 1 mL pada masing-masing konsentrasi dan ditambahkan sebanyak 3 mL reagen FRAP lalu diamkan sesuai waktu operating time yang didapatkan. Setelah itu, dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang maksimum. Aktivitas antioksidan ditentukan dengan pembacaan absorbansi sebanyak 3 kali dan hasilnya dinyatakan dalam mmol Fe^{2+} /mg sampel (Damanis *et al.*, 2020).

i. Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun rosella

Ekstrak etanol daun rosella Sebanyak 10 mg, dilarutkan dengan aquades pada labu takar 10 mL sampai diperoleh konsentrasi sebesar 1000 ppm. Kemudian dilakukan orientasi dalam 5 seri konsentrasi yaitu 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm. Pada konsentrasi tersebut didapatkan nilai absorbansi yang tidak stabil, sehingga digunakan konsentrasi 150, 175, 200, 225 dan 250 ppm. Diambil 1 mL pada masing-masing konsentrasi tersebut dimasukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan 3 mL reagen FRAP dan ditambahkan dengan aquades 1 mL. Setelah itu, dibaca absorbansinya dalam panjang gelombang maksimum yang didapatkan dari hasil panjang gelombang maksimum. Aktivitas antioksidan ditentukan dengan pembacaan absorbansi sebanyak 3 kali dan hasilnya dinyatakan dalam mmol Fe^{2+} /mg sampel.

H. Metode Analisis Data

1. Nilai Rendemen Ekstrak

Nilai rendemen bisa didapatkan dengan cara jumlah ekstrak yang dihasilkan dibagi jumlah simplisia yang digunakan lalu dikali 100%.

$$\%Rendemen = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$

2. Nilai Rf

Nilai Rf dapat diperoleh dari jarak yang ditempuh oleh zat yang diteliti dibagi jarak yang ditempuh oleh pelarut.

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh zat yang diteliti}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

3. Uji aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dihitung dari data absorbansi ekstrak etanol daun rosella dan vitamin C sebagai pembanding. Dihitung parameter FRAP *value* menggunakan larutan standar $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ untuk mendapatkan kurva kalibrasi regresi linier untuk menghitung konsentrasi, $y = bx + a$, di mana (x) adalah konsentrasi yang akan diukur dan (y) adalah absorbansi dari setiap sampel. Setelah diperoleh konsentrasi, dilakukan perhitungan FRAP *value* dengan rumus:

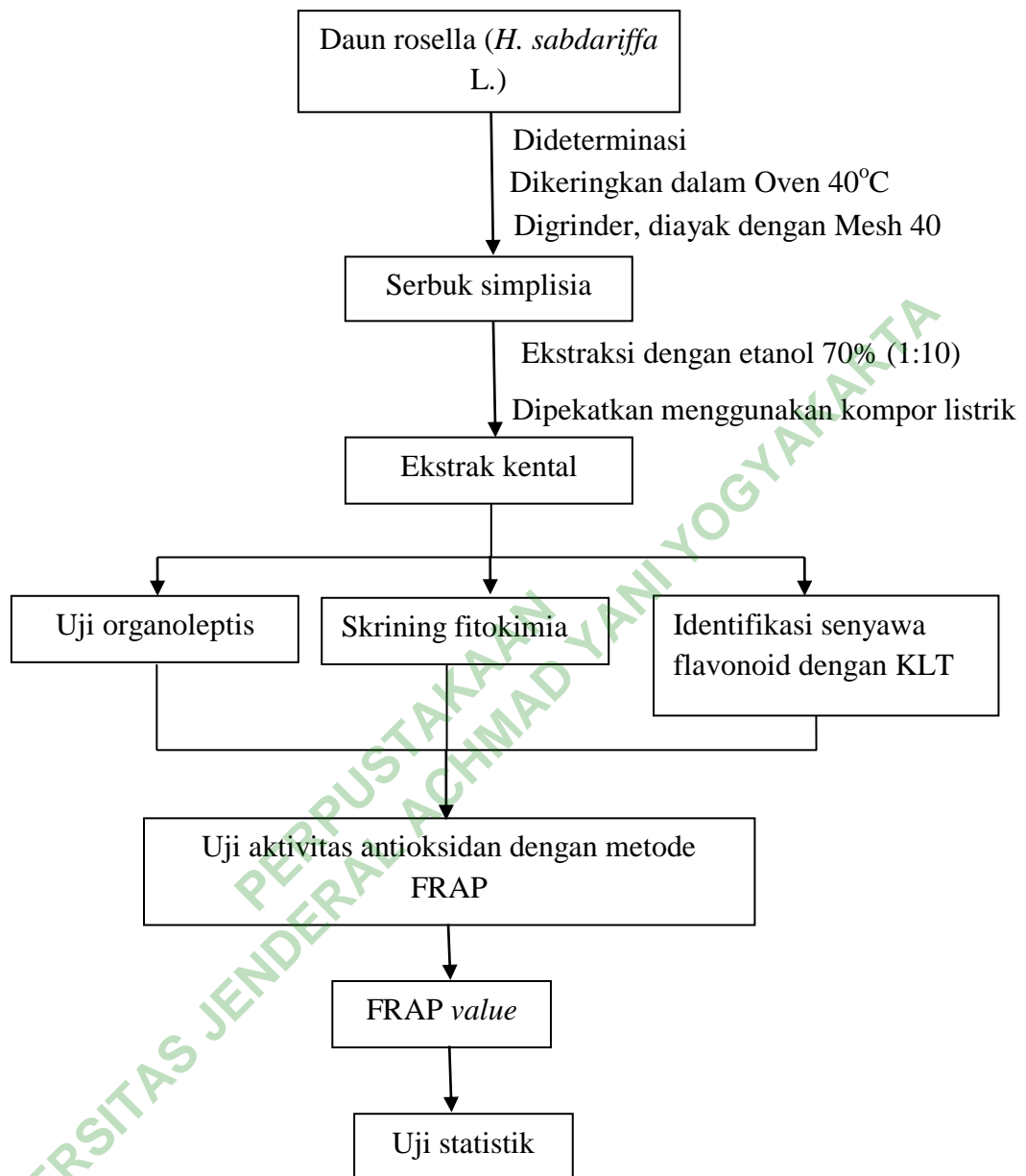
$$\text{FRAP value} = \frac{C \times V \times fp}{\text{berat awal sampel}}$$

Dimana C adalah konsentrasi, V adalah volume yang digunakan, fp adalah faktor pengenceran untuk berat awal sampel, semakin tinggi nilai FRAP *value* maka kapasitas sampel untuk mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} akan semakin baik aktivitas antioksidannya (Utami, 2020).

4. Uji statistik

Dilakukan analisis statistik dari data yang didapat dari pengujian aktivitas antioksidan untuk mengetahui apakah aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol daun rosella dengan vitamin C terdapat

perbedaan yang signifikan atau tidak. Pertama dilakukan uji normalitas. Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan *Shapiro-Wilk*, untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak. Jika hasil nilai signifikan ($p > 0,05$) dapat dikatakan data berdistribusi normal. Selanjutnya uji homogenitas. Dilakukan uji homogenitas guna mengetahui apakah data bersifat homogen atau tidak. Uji tersebut dilakukan sebagai syarat analisis statistik dengan menggunakan uji *Independent T-test*. Apabila nilai signifikan ($p\text{-value}$) $> 0,05$ bisa dikatakan data sama (homogen), sehingga bisa dilanjutkan *Independent T-test* (Aditya Setyawan, 2021). Digunakan *Independent T-test* karena data yang digunakan dalam penelitian ini adalah dua kelompok bebas dan untuk mengetahui apakah ditemukan perbedaan yang signifikan aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol daun rosella dengan vitamin C dengan hasil nilai signifikan ($p < 0,05$) (Safitri *et al.*, 2020).



Gambar 9. Skema Pelaksanaan Penelitian