

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian eksperimental ini dilakukan dengan pendekatan komparatif untuk mengetahui pengaruh metode ekstraksi maserasi dengan *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE) dalam uji aktivitas antioksidan dari ekstrak herba seledri (*Apium graveolens* L.). Penelitian ini menggunakan analisis kualitatif berupa uji organoleptik, skrining fitokimia dan identifikasi senyawa flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Analisis kuantitatif berupa uji aktivitas antioksidan dengan metode FRAP yang dinyatakan dengan nilai FRAP *Value* dan standar kuersetin sebagai larutan pembanding. Rendemen = (Berat ekstrak kental)/(Berat serbuk simplisia) x 100%

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Prodi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan Mei 2025 – Juni 2025.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Pada penelitian ini populasi yang digunakan ialah tanaman seledri (*Apium graveolens* L.) yang didapatkan dari perkebunan salah satu warga di Desa Pogalan, Kec. Pakis, Kab. Magelang, Jawa Tengah (7°27'44.8"S 110°23'40.0"E).

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini dikumpulkan menggunakan metode random sampling, dimana tanaman seledri dipanen 40 hari setelah penanaman dengan kriteria tanaman dan waktu pengambilan sampel mengikuti penelitian Khoiriyah (2021) yaitu diambil pada pagi hari pada pukul 07.00 WIB dan dipilih yang masih segar dan berwarna hijau.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas penelitian ini ialah metode ekstraksi yaitu, metode ekstraksi maserasi dan metode ekstraksi *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE)
2. Variabel terikat penelitian ini ialah FRAP *Value*.
3. Variabel terkontrol penelitian ini ialah waktu panen, tempat tumbuh tanaman, suhu pengeringan, pelarut, suhu ekstraksi, waktu ekstraksi, ukuran *magnetic stirrer* dan suhu pengentalan.

E. Definisi Operasional

1. Simplisia Herba Seledri

Simplisia herba seledri terdiri dari keseluruhan bagian tanaman yaitu batang dan daun.

2. FRAP (*Ferric Reducting Antioxydant Power*)

FRAP adalah salah satu metode pengujian aktivitas antioksidan.

3. Skrining Fitokimia

Pemeriksaan terhadap golongan senyawa kimia dilakukan untuk mengidentifikasi adanya senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak etanol herba seledri yang akan diteliti.

4. *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE)

Ultrasonic-assisted Extraction (UAE) adalah salah satu metode ekstraksi dengan gelombang ultrasonic.

5. Maserasi yang dimodifikasi

Maserasi yang dimodifikasi merupakan metode maserasi yang dimodifikasi dengan suhu & waktu sesuai dengan metode UAE.

6. Kuersetin

Kuersetin termasuk dalam kelompok senyawa flavonol, yang merupakan salah satu turunan dari golongan flavonoid. Senyawa ini memiliki struktur dasar berupa 3-hidroksiflavan, yang menjadi ciri khas dari klasifikasi flavonol dalam sistem flavonoid.

7. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis merupakan kromatografi serapan yang memiliki fasa diam berupa zat padat dengan fase gerak berupa zat cair.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Spektrofotometer UV-Vis (*Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis*), timbangan analitik (*Ohaus PX224/E*), sonikator (*GT Sonic*), *magnetic stirrer* dan *hot plate* (*IKA C-Mag HS 7*), bejana, grinder (*Fomac*), *micropipet*, propipet, pipet tetes, pipet ukur (*Iwaki*), tabung reaksi (*Iwaki*), toples kaca, rak tabung reaksi, batang pengaduk, gelas beker (*Iwaki*), Erlenmeyer (*Iwaki*), labu takar (*Iwaki*), Oven (*Memmert UN-55*), wajan, kompor listrik, vortex, botol kaca, ayakan 40 *mesh*, *waterbath*, lampu UV 254 dan 356 nm.

2. Bahan

Herba seledri, etanol 70% (teknis), pereaksi mayer (reagen), pereaksi dragendorff (reagen), pereaksi wagner (reagen), kain penyaring, metanol (p.a), HCl (*merck*), kertas saring, FeCl₃·6H₂O (*merck*), standar kuersetin (p.a), TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) (*merck*), FeSO₄·7H₂O (*merck*), etanol p.a, water for injection (WFI), asam asetat glasial (*merck*), plat KLT *silica gel* F₂₅₄, toluen (smart lab), etil asetat (*merck*), metanol (*merck*), natrium asetat anhidrat (*merck*), akuades, pipa kapiler (1 μL), *white tip*, *yellow tip*, *blue tip*.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengumpulan Bahan dan Determinasi

Tanaman seledri (*Apium graveolens* L.) didapatkan dari Desa Pologan, Kec. Pakis, Kab. Magelang, Jawa Tengah. Tanaman seledri dipanen setelah 40 hari penanaman dan diambil pada pagi hari dengan spesifikasi daun dan batang yang berwarna hijau muda (Khoiriyah 2021). Proses deteminasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan. Determinasi tanaman pada herba seledri berfungsi untuk mengetahui kebenaran sampel herba seledri yang digunakan pada penelitian.

2. Persiapan Sampel

Herba seledri sejumlah 3kg dipisahkan bagian daun dan batang, lalu disortasi basah pada bagian daun dan batang. Kemudian dicuci dengan air mengalir guna memisahkan kotoran - kotoran yang menempel dan daun yang sudah rusak. Setelah itu, ditiriskan dan dikering anginkan. Langkah berikutnya dilakukan sortasi ulang untuk memastikan daun dan batang yang utuh dan untuk menghilangkan kotoran yang masih tertinggal. Kemudian dilakukan pengeringan pada daun dan batang yang telah dirajang hingga berbentuk bagian-bagian kecil (± 5 cm) menggunakan oven dengan suhu yang 40°C selama 2 hari atau hingga mudah hancur apabila diremas. Kemudian dihaluskan dengan grinder dan diayak dengan ayakan 40 *mesh* untuk memperkecil ukuran partikel dan memperbesar kontak dengan pelarut (Khoiriyah 2021). Apabila ada yang tidak lolos ayakan 40 *mesh* maka dihaluskan kembali hingga lolos *mesh*. Serbuk simplisia yang diperoleh selanjutnya diekstraksi dengan dua metode ekstraksi yang berbeda yaitu maserasi dan *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE).

3. Penetapan Kadar Air Simplisia

Sebanyak 0,5 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam alat *Moisture balance*, kemudian alat dioperasikan pada suhu 105°C (Mastuti *et al.*, 2024). Dilakukan hingga diperoleh angka stabil yang ditandai dengan adanya perubahan warna lampu indikator yang semula merah menjadi hijau.

4. Pembuatan ekstrak herba seledri.

Pada penelitian ini digunakan dua metode ekstraksi diantaranya yaitu Maserasi dan *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE).

a. *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE).

Metode ekstraksi *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE) ini mengacu pada penelitian Septiana *et al* (2023) dengan modifikasi pada jumlah serbuk, suhu dan waktu yang dilakukan dengan cara merendam 25 gram serbuk seledri kering ke dalam 500 ml etanol 70% (1:20) pada labu Erlenmeyer 500 mL. Labu tersebut dimasukkan ke dalam alat *ultrasonic bath* pada suhu 25°C selama 30 menit. Proses ekstraksi dilakukan dalam tiga batch, sehingga total serbuk yang diekstraksi yaitu 75 gram. Dilakukan dengan cara yang sama

pada saat melakukan ekstraksi batch yang pertama. Kemudian, larutan disaring dengan kertas saring dan dikeringkan menggunakan *waterbath* pada suhu 40° - 50°C (Septiana *et al.*, 2023).

b. Maserasi

Metode maserasi yang dilakukan yaitu maserasi dengan modifikasi yang disesuaikan dengan metode *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE). Sejumlah 25 gram serbuk seledri direndam dalam 500 mL etanol 70%, kemudian diaduk dengan pengaduk magnetic stirrer selama 30 menit pada suhu 25°C diatas *hot plate*. Proses ekstraksi dilakukan dalam tiga replikasi, sehingga total serbuk yang digunakan pada metode ini sejumlah 75 gram. Kemudian larutan disaring dengan kertas saring dan dikeringkan dengan *waterbath* pada suhu 40° - 50°C (Septiana *et al.*, 2023). Setelah proses ekstraksi, lalu ditimbang ekstrak dan dihitung nilai rendemennya pada Persamaan (1).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat serbuk simplisia}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

c. Penetapan Kadar Air Ekstrak

Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan ke dalam alat *Moisture balance*, kemudian alat dioperasikan pada suhu 105°C (Mastuti *et al.*, 2024). Dilakukan hingga diperoleh angka stabil yang ditandai dengan adanya perubahan warna lampu indikator yang semula merah menjadi hijau.

d. Uji Organoleptik

Uji organoleptik pada ekstrak bertujuan agar dapat mendeskripsikan bentuk, warna, dan bau pada ekstrak (Dewi I. K., 2021).

e. Skrining Fitokimia

1) Uji Alkaloid

Sejumlah 0,25 g ekstrak dilarutkan dalam 5 ml HCl 2N dan dibagi menjadi 3 tabung reaksi. Ditambahkan 5-7 tetes reagen Dragendorff (yang menghasilkan warna merah atau jingga), reagen Mayer (yang menghasilkan endapan berwarna putih), dan reagen Wagner (yang

menghasilkan endapan berwarna coklat) hingga terbentuk perubahan warna atau endapan. Jika 2 dari 3 reagen menunjukkan hasil yang positif maka dapat dikatakan sampel mengandung alkaloid (Khoiriyah, 2021).

2) Uji Tanin

Sejumlah 0,25 g ekstrak dicampurkan menggunakan air sebanyak 50 ml, kemudian selama 15 menit dididihkan. Selanjutnya, campuran didinginkan dan digunakan kertas saring untuk menyaring campuran yang sudah dingin. Diambil 5 ml filtrat dan menambahkan larutan besi (III) klorida 1% hingga muncul warna biru pekat atau hijau pekat. Hal ini membuktikan adanya kandungan tanin pada ekstrak (Khoiriyah, 2021)

3) Uji Flavonoid

Sejumlah 0,25 g ekstrak di didihkan menggunakan air panas sebanyak 50 ml dengan waktu 5 menit. Selanjutnya, tambahkan filtrat sejumlah 5 ml dengan magnesium serbuk secukupnya, kemudian masukkan HCl 2N sebanyak 1 ml. Hasil dikatakan positif jika terbentuknya warna seperti merah, kuning ataupun jingga (Khoiriyah, 2021).

4) Uji Triterpenoid/Steroid

Sejumlah 0,25 g sampel ekstrak diambil, lalu asam asetat glasial 2 tetes dan asam sulfat pekat 1 tetes ditambahkan. Jika terjadi pembentukan warna menjadi warna merah atau kuning maka positif terpenoid. Apabila terbentuk warna hijau berarti positif steroid (Khoiriyah, 2021).

5) Uji Saponin

Sejumlah 0,25 g sampel ekstrak dipanaskan menggunakan 50 ml air panas dengan waktu 5 menit. Kemudian, diambil filtrat sejumlah 10 ml dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok dengan kuat selama 10 menit secara vertikal. Jika membentuk busa dengan tinggi 1-10 cm yang stabil dalam waktu 10 detik dan tidak menghilang setelah menambahkan 1 tetes HCl 2N, hal ini menunjukkan adanya saponin (Khoiriyah, 2021).

f. Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

1) Preparasi Plat KLT dan Penjenuhan *Chamber*

Pemilihan fase gerak ini didapatkan melalui proses orientasi dan optimasi. Preparasi penjenuhan *chamber* diawali dengan mencampurkan toluene: etil asetat: asam format yang digunakan sebagai fase gerak dibuat dalam 10 ml dengan perbandingan 7 : 2,5 : 0,5. Dimasukkan campuran tersebut ke dalam sebuah *chamber*, yang kemudian diletakkan kertas saring berukuran 10 cm didalamnya. *Chamber* ditutup dengan rapat lalu biarkan kertas saring terendam pada fase gerak hingga menunjukkan bahwa *chamber* telah jenuh (Khoiriyah, 2021).

2) Pembuatan Larutan Uji dan Standar Kuersetin

Sampel ekstrak ditimbang 100 mg, lalu dilarutkan dalam labu takar 10 ml menggunakan pelarut etanol p.a. Ditambahkan sampai tanda batas dan divortex yang berikutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring, sehingga didapatkan konsentrasi 10.000 ppm. Sampel kuersetin ditimbang sebanyak 2 mg dan dilarutkan dalam 2 mL etanol p.a sehingga didapatkan konsentrasi kuersetin 1000 ppm.

3) Prosedur KLT

Plat KLT dilakukan proses pemanasan menggunakan oven dengan suhu 100°C dalam waktu 30 menit, untuk mengurangi kandungan air pada plat, sehingga daya serapnya akan optimal. Selanjutnya dibuat tanda atas dan bawah dengan jarak 1 cm. Dilakukan penotolan standar kuersetin sejumlah 2 µL (2 totolan) dan ekstrak sampel sejumlah 5 µL (5 totolan) dengan pipa kapiler pada tanda bawah plat KLT yang sudah dibuat dan diberi jarak 1 cm antara sampel dengan standar. Jika *chamber* sudah jenuh, diletakkan plat KLT dalam *chamber* dan diamati sampai eluen naik. Kemudian diambil plat KLT lalu dikering-anginkan dan diamati noda dengan bantuan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Hitung nilai R_f (*Retention Factor*) (Khoiriyah 2021). Nilai R_f sampel dan standar kuersetin dapat dianalisa menggunakan Persamaan (2).

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh analit}}{\text{Jarak tempuh pelarut}} \dots \dots \dots (2)$$

5. Uji Aktivitas Antioksidan FRAP (Nurhayati, 2022)

a. Preparasi Larutan FRAP (*Ferric Reducting Antioxydant Power*)

1) Buffer Asetat pH 3,6

Natrium asetat anhidrat (CH_3COONa) ditimbang sebanyak 0,775 gram, kemudian campurkan asam asetat pekat sebanyak 4 ml, lalu akuades dilarutkan dalam labu ukur sampai 250 ml. Bobot molekul dari natrium asetat anhidrat adalah 82,03 g/mol.

2) Pembuatan Larutan TPTZ 10 mmol/L

Sebanyak 31 mg TPTZ dilarutkan dalam 40 mmol/L HCl hingga tepat 10 mL. Larutan 40 mmol/L dibuat dengan melarutkan 380 μ L HCl pekat dalam 100 mL akuades. Bobot molekul dari TPTZ adalah 312,34 g/mol.

3) Pembuatan Larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,12 mmol/L

Pada labu takar, sejumlah 32,44 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ditimbang dan dilarutkan dengan buffer asetat sebanyak 10 ml. Bobot molekul dari $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ adalah 270,33 g/mol.

4) Pembuatan Reagent FRAP

Buffer asetat diambil 25 ml, TPTZ 2,5 ml dan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,5 ml kemudian dicampurkan dengan perbandingan 10:1:1 dalam labu takar untuk memudahkan pencampuran.

b. Pembuatan Larutan Induk dan Seri Konsentrasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Sebanyak 25 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan akuades pada labu takar 25 ml sampai diperoleh konsentrasi sebesar 1000 ppm. Dibuat seri konsentrasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm dengan cara di pipet 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mL kemudian dicukupkan dengan akuades dalam labu ukur 5 mL sampai tanda batas atas (Firdausia, *et al.*, 2023).

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Dipipet larutan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,1 mL dengan konsentrasi 1000 ppm, lalu ditambahkan 1,5 mL reagen FRAP, kemudian dibaca pada rentang

panjang gelombang 588-610 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang yang digunakan yaitu 596 nm (Fauziah *et al.*, 2023).

d. Penentuan *Operating Time*

Dipipet larutan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,1 mL dengan konsentrasi 60 ppm, tambahkan 1,5 mL reagen FRAP, setelah itu, dilakukan penentuan *operating time* menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan selama 45 menit dengan interval 1 menit untuk mendapatkan absorbansi yang stabil yaitu pada menit ke 14 - 17.

e. Penentuan Aktivitas Antioksidan Kuersetin

Diambil 1 mg kuersetin dan ditimbang seksama menggunakan timbangan analitik, lalu dilarutkan menggunakan etanol p.a hingga tercampur pada labu ukur 10 mL. Larutan kuersetin kemudian dibuat dalam konsentrasi 20 ppm. Diambil 2 mL ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dihomogenkan dan dicukupkan volumenya menggunakan etanol p.a hingga tanda batas. Setiap larutan uji diambil 0,1 mL, dimasukkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 1,5 mL reagen FRAP, ditutup menggunakan aluminium foil digojog sampai tercampur. Didiamkan pada suhu ruang selama 14 menit. Kemudian dibaca pada spektrofotometri UV-Vis untuk mendapatkan nilai absorbansi dengan panjang gelombang 596 nm dan dilakukan replikasi.

f. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Herba Seledri

Sebanyak 10 mg ekstrak ditimbang seksama, kemudian 10 ml etanol p.a. kemudian divortex hingga homogen dan dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring. Larutan ekstrak etanol kemudian dibuat dalam konsentrasi 20 ppm. Diambil 0,20 mL dan dicukupkan pada labu 10 mL sampai tanda batas menggunakan pelarut etanol p.a lalu digojog sampai tercampur. Larutan uji diambil 0,1 mL dimasukkan pada tabung reaksi dengan menambahkan reagen FRAP sebanyak 1,5 mL digojog hingga tercampur. Didiamkan pada tabung reaksi dengan ditutup menggunakan aluminium foil pada suhu ruang selama 14 menit dan di tempat yang gelap. Selanjutnya ditentukan nilai absorbansi dengan panjang gelombang 596 nm dan dilakukan replikasi.

H. Metode Analisis dan Pengelolaan Data

1. Analisis Data Penentuan FRAP *Value*

Analisis aktivitas antioksidan dengan FRAP diawali dengan regresi linier. Absorbansi merupakan variable y dan konsentrasi larutan adalah variable x. Penentuan kadar antioksidan ekstrak herba seledri dengan persamaan (3).

$$y = b x + a \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan :

- y = absorbansi
- b = intersep
- x = konsentrasi/kadar senyawa
- a = *slope* (kemiringan)

Aktivitas antioksidan sampel melalui metode FRAP ditentukan berdasarkan persamaan regresi linier antara konsentrasi dan nilai absorbansi dari larutan standar $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Persamaan tersebut digunakan untuk menghitung konsentrasi masing-masing sampel. Setelah konsentrasi diperoleh, nilai FRAP *Value* dari setiap sampel dihitung menggunakan rumus yang tercantum pada Persamaan (3) (Fauziah *et al.*, 2023).

$$FRAP\ Value = \frac{c \ x \ V \ x \ FP}{\text{bobot sampel}} \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan:

- C : konsentrasi sampel atau nilai x (mmol/L)
- V : volume cuplikan yang digunakan (mL)
- Fp : faktor pengenceran
- Bobot sampel : berat sampel yang digunakan (g)

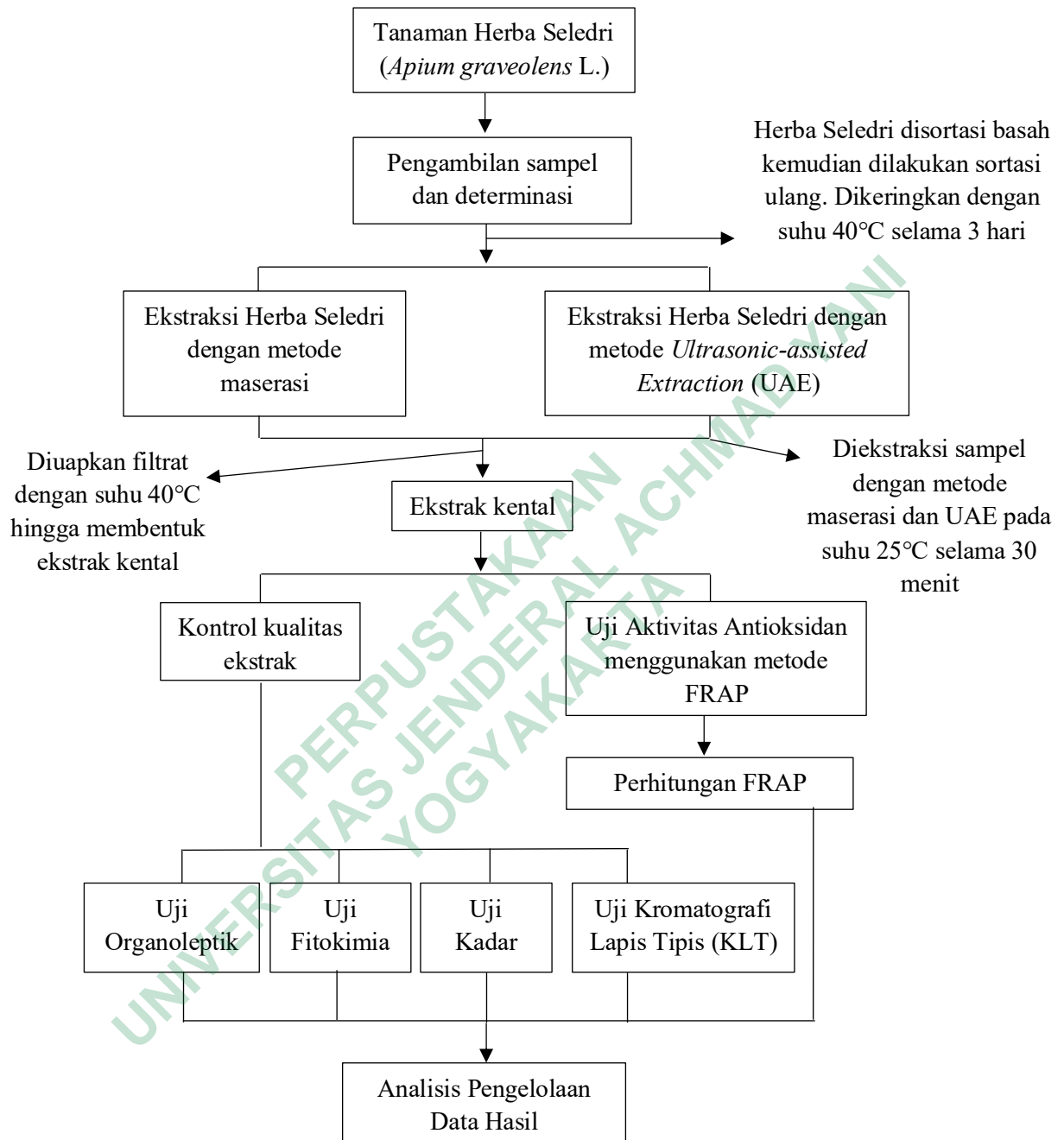
2. Analisis Data Statistik

Pengolahan data secara statistik menggunakan SPSS. Langkah-langkah uji SPSS sebagai berikut: (Rahayu *et al.*, 2025)

- a. Uji normalitas *Shapiro-Wilk* digunakan karena jumlah sampel yang dianalisis kurang dari 50. Selanjutnya, uji homogenitas *Levene's* dilakukan untuk memastikan bahwa dua atau lebih kelompok data sampel memiliki varians yang serupa. Uji ini bertujuan untuk memverifikasi bahwa variasi dalam setiap kelompok sampel tidak berbeda secara signifikan.
- b. Apabila data memenuhi syarat normalitas dan homogenitas, maka analisis dilakukan menggunakan uji T *Independent*. Jika nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 ($\alpha=5\%$), maka dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan dalam hasil nilai FRAP *Value* sampel antara kedua jenis metode ekstraksi tersebut.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA

Alur Penelitian :



Gambar 6. Alur Penelitian