

BAB III

METODE PENELITIAN

1.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat eksperimental yang dilakukan dengan melihat kandungan flavanoid total dan uji aktivitas antioksidan yang ada pada ekstrak etanol kulit pisang goroho (*Musa Acuminata L.*). Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2023 – Maret 2023 di Laboratorium Kimia Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Sahid Surakarta.

1.2 Populasi dan Sampel

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas obyek/subyek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya. Populasi pada penelitian ini adalah kulit pisang goroho (*Musa Acuminata L.*) yang berasal dari daerah Banggai Kepulauan, Provinsi Sulawesi Tengah. Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut (Hermawan & others, 2019). Sampel penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit pisang goroho (*Musa Acuminata L.*).

1.3 Alat dan Bahan

a. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah Alat-alat gelas (*Pyrex*), Neraca analitik (*Acis*), Lampu UV 366 nm (*Philips*), Maserator (*Pyrex*), Alat

pemotong, Spektrofotometer *UV-Vis (Gynesis)*, dan *Vacum rotary evaporator (Bio Base)*, Batang pengaduk, Waterbath, Botol kaca gelap, ayakan 40 mesh.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Quersetin (*Merck*), Ekstrak etanol kulit pisang goroho (*Musa Acuminafe L.*), Aseton (*Merck*), Asam borat (*Merck*), Asam oksalat (*Emsure*), Eter (*Merck*), Natrium asetat (*Merck*), $AlCl_3$ (*Emsure*), Aquadest (*Emsure*), Etanol 96% (Rachma sari), kertas saring (*Merck*), DPPH (*merck*), Vitamin C (*Merck*).

1.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah poin-poin yang menjadi karakteristik suatu penelitian. Dalam penelitian ini ada dua jenis variabel :

a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol pada kulit pisang goroho (*Musa Acuminafe L.*).

b. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah uji kualitatif flavonoid, kandungan flavonoid total dari kulit pisang goroho (*Musa Acuminafe L.*) serta aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

1.5 Definisi Operasional

Definisi operasional adalah definisi yang membatasi ruang lingkup atau variabel – variabel yang diteliti. Definisi operasional pada penelitian ini adalah:

a. Konsentrasi Ekstrak Etanol Kulit Pisang Goroho

Konsentrasi ekstrak etanol kulit pisang goroho adalah besarnya konsentrasi ekstrak etanol kulit pisang goroho yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm.

b. Kandungan Flavonoid

Kandungan flavanoid adalah besarnya kandungan flavanoid total dari ekstrak etanol kulit pisang goroho yang dinyatakan dalam mg/g *Quersetin Ekuivalen* (mg/g QE).

c. Aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan kulit pisang goroho yang dinyatakan dalam % IC_{50} . (*Inhibitor Concentration*) 50% atau IC_{50} merupakan nilai konsentrasi pada ekstrak etanol daun kulit pisang goroho yang menghasilkan penangkapan 50% senyawa radikal dalam satuan ppm.

1.6 Jalannya Penelitian

1.6.1 Determinasi

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman untuk menetapkan kebenaran yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi pada sampel tanaman pisang goroho (*Musa Acuminata L.*) secara makroskopi dan dengan panduan buku yang dibuktikan di Laboratorium Universitas Setia Budi.

1.6.2 Penyiapan Simplisia

Penyiapan simplisia meliputi (Prasetyo *et al*, 2013) :

a. Pengumpulan bahan baku

Pengumpulan bahan baku dilakukan dengan cara mengambil bagian kulit dari tanaman pisang goroho (*Musa Acuminata L.*) dengan usia panen pisang goroho 80-100 hari.

b. Sortasi basah

Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan cecair (kotoran dan benda asing lain) dari bahan simplisia. Pembersihan simplisia dari tanah dapat mengurangi jumlah kontaminasi mikrobiologi. Sortasi basah dilakukan dengan cara memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari bahan simplisia.

c. Pencucian

Pencucian dilakukan dengan air mengalir dan menggunakan air bersih.

d. Perajangan

Perajangan dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan, dan penggilingan. Semakin tipis bahan yang dikeringkan, semakin cepat penguapan air yang dikandung, sehingga mempercepat waktu pengeringan. Perajangan dapat dilakukan dengan pisau atau dengan alat mesin perajang khusus simplisia diiris atau dipotong sehingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran yang dikehendaki.

e. Pengeringan

Pengeringan bertujuan agar simplisia tidak cepat rusak dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lebih lama. Dengan berkurangnya kadar air, maka reaksi enzimatik dapat dicegah sehingga penurunan mutu atau kerusakan simplisia dapat dihindari. Pengeringan menggunakan oven dilakukan pada suhu 60°C.

f. Sortasi Kering

Tujuan sortasi adalah untuk memisahkan benda asing, seperti bagian tumbuhan yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang masih tertinggal pada simplisia kering yang telah di oven.

g. Pengepakan dan penyimpanan

Simplisia disimpan pada suhu sesuai dengan sifat dan ketahanan simplisia, serta dihindarkan dari faktor-faktor yang dapat mempengaruhi mutu simplisia.

1.6.3 Ekstraksi Sampel

Pembuatan ekstrak pada penelitian ini, metode yang digunakan yaitu metode ekstraksi secara dingin maserasi, pada dasarnya metode ini merupakan metode yang sederhana dengan cara merendam serbuk simplisia yang akan digunakan dengan menggunakan pelarut yang sesuai selama beberapa hari pada suhu kamar. Serbuk simplisia kering 300 gram

dimaserasi 3 x 24 jam pada suhu kamar menggunakan pelarut etanol 96% dengan menggunakan perbandingan 1:10 (b/v), setelah itu dilakukan pengadukan sesekali, dilakukan remaserasi 1 x 24 jam. penyaringan dilakukan dengan menggunakan corong, kemudian filtrat digabung dan diuapkan sampai diperoleh ekstrak kental (Wahyuni *et al*, 2020).

1.6.4 Pemeriksaan Kualitatif Flavonoid

Uji taubeck dilakukan dengan menguapkan larutan uji 1 mL, basahi residu dengan aseton tambahkan sedikit serbuk asam borat dan asam oksalat. Panaskan dengan hati-hati dalam penangas air, jangan terlalu panas. Campur residu dengan yang dihasilkan dengan 2 mL eter. Amati dibawah UV 366 nm hasil positif apabila terbentuk fluoresensi kuning (Safitri *et al*, 2020)

1.6.5 Analisis Kandungan Flavonoid Total

a. Pembuatan Larutan Standar Quersetin

Ditimbang 25 mg baku quersetin dan dilarutkan dalam 25 mL etanol pa sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm sebagai larutan stok baku quersetin.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Quersetin

Dipipet larutan standar quersetin 45 ppm sebanyak 0.5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL. Ditambahkan 0,1 mL larutan alumunium klorida 10%, 0,1 mL natrium asetat I M dan dicukupkan dengan aquades p.a hingga tanda batas. Setelah itu diinkubasi selama 30

menit pada suhu kamar. Ukur panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer *UV-Vis* dengan rentang 400 nm - 800 nm, dan didapatkan panjang gelombang maksimum 434 nm (Candra,L.L.M, 2021)

c. Penentuan Waktu Kerja (*Operating Time*)

Larutan standar quersetin 45 ppm dipipet sebanyak 0,5 ml. dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL. Ditambahkan 0,1 mL larutan aluminium klorida 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M dan dicukupkan dengan aquades p.a hingga tanda batas. Ukur absorbansi larutan dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 434 nm setiap 1 menit dan diamati dalam 30-60 menit. *Operating time* yang didapatkan adalah pada menit ke-54 (Candra,L.L.M, 2021)

d. Pembuatan Kurva Baku Quersetin

Dipipet larutan standar quersetin 1000 ppm sebanyak 0,25; 0,45; 0,65; 0,85; 1,05 dan 1,25 mL dan dicukupkan dengan etanol p.a hingga 10 mL, sehingga dihasilkan konsentrasi 25; 45; 65; 85; 105; 125 ppm, dipipet masing-masing konsentrasi larutan standar quersetin sebanyak 0,5 mL kedalam labu takar. Ditambahkan 0,1 mL larutan aluminium klorida 10% 0,1 mL, natrium asetat 1 M dan 2,8 mL aquades p.a. Diinkubasi sesuai *operating time* pada suhu kamar dan ukur absorbansinya dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum (Candra,L.L.M, 2021)

e. Kandungan Flavonoid Total Sampel

Larutan uji ekstrak dibuat dengan 0,1 g ekstrak dengan etanol p.a dalam labu ukur 10 mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10.000 ppm. Sebanyak 0,5 mL larutan uji dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL dan ditambah dengan 0,10 mL aluminium klorida 10%, 0,10 mL natrium asetat 1 M dan 2,80 mL aquades p.a. Larutan diinkubasi selama *operating time* 54 menit pada suhu kamar. Serapannya diukur pada panjang gelombang maksimum 434 nm menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*. Pengujian dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (triplo) (Candra,L.L.M, 2021)

1.6.6 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 15,77 mg DPPH ditimbang kemudian dilarutkan dengan etanol p.a dilabu ukur 100 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 mM. larutan DPPH disimpan dalam wadah yang dilapisi aluminium foil. (Tristantini et al., 2016).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH sebanyak 2 mL dipipet kedalam labu ukur 5 mL kemudian dicukupkan volumenya sampai 5 mL dengan etanol p.a, dihomogenkan kemudian dibiarkan selama 30 menit, selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan

spektrofotometer *UV-Vis*. Didapatkan panjang gelombang maksimum 517 nm. (Ferdinan & Parsetya 2018)

c. Pembuatan Kontrol DPPH

Sebanyak 2 mL larutan DPPH dari larutan induk ditambah etanol p.a 3 mL di labu ukur 5 mL kemudian di gojog sampai homogen di wadah gelap. Ukur absorbansi. Larutan kontrol DPPH digunakan sebagai kontrol saat melakukan uji pada sampel penelitian . (Ferdinan & Parsetya 2018)

d. Pembuatan Larutan Uji Antioksidan Sampel

Ekstrak kental sebanyak 100 mg dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas. Sehingga diperoleh larutan stok sampel 4000 ppm. Dibuat seri konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm dan 800 ppm . (Ferdinan & Parsetya 2018).

e. Pembuatan Larutan Asam Askorbat (Vitamin C) sebagai Kontrol Positif

Kontrol positif yang menggunakan vitamin C, sebanyak 10 mg vitamin C dilarutkan dengan 10 mL etanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm digunakan sebagai larutan induk. Kemudian dibuat seri konsetrasi 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm, 2,5 ppm, 3 ppm.

f. Penentuan Aktivitas Antioksidan Sampel dan Vitamin C

Masing-masing konsentrasi dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL, ditambahkan 2 mL DPPH dan di *ad* etanol p.a hingga tanda batas. Di inkubasi selama 30 menit diukur absorbansi pada panjang gelombang 517 nm. Dilakukan 3 x replikasi. Cara yang sama dilakukan untuk kontrol positif vitamin C.

1.7 Analisis Data

a. Analisis Kualitatif Kandungan Flavonoid

Ekstrak kental dari daun pisang goroho dilakukan identifikasi mengandung senyawa flavonoid dengan *uji taubeck* yang ditandai dengan terbentuk fluoresensi kuning saat di amati dibawah UV 366.

b. Penetapan Kandungan Flavonoid Total

Kandungan flavonoid dihitung berdasarkan dari persamaan *regresi linier* kurva kalibrasi larutan standar quersetin dari hasil pembacaan alat spektrofotometer *UV-Vis*. Nilai absorbansi (ppm) dimasukkan kedalam rumus *regresi linier* sebagai nilai y, sedangkan nilai x sebagai konsentrasi flavonoid yang ada pada larutan sampel kerja. Hasil dinyatakan secara *triplo* dan kandungan flavonoid dinyatakan dengan kesetaraan standar flavonoid menggunakan baku standar quersetin (Dhiman *et al*, 2019).

Kandungan flavonoid dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$y = bx + a \qquad x = \frac{y - a}{b}$$

dengan :

y = absorbansi

x = kadar sampel (ppm atau mg/L)

a = *intersep*

b = *slope*

Perhitungan kandungan flavonoid total dihitung dengan rumus berikut :

$$\text{Kandungan flavonoid total (mg/g EQ)} = \frac{cf \times V \times FP}{M}$$

Dengan :

Cf = konsentrasi flavonoid total dari persamaan regresi (ppm atau mg/L)

V = volume sampel (L)

FP = faktor pengenceran

M = berat sampel (g)

c. Aktivitas antioksidan IC₅₀

Persentase aktivitas antioksidan dari ekstrak kulit pisang goroho dalam menangkap atau merendam radikal bebas DPPH yang dinyatakan dalam % inhibisi, yang diperoleh dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_k - A_s}{A_k} \times 100\%$$

Keterangan :

A_k = Absorbansi Kontrol

A_s = Absorbansi Sampel

Nilai IC_{50} pada penangkapan radikal DPPH diperoleh berdasarkan persamaan regresi linier seri konsentrasi sampel terhadap persen penghambatan, $y = a+bx$.

Nilai IC_{50} dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$