

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Penelitian yang akan dilakukan bersifat eksperimental di Laboratorium Kimia dengan menggunakan serbuk simplisia kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) ekstrak etanol 96% yang akan diuji aktivitas antioksidan. Adapun variabel penelitian diantaranya metode ekstrak simplisia kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), pelarut, rendemen, organoleptis, senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid/triterpenoid, dan nilai IC<sub>50</sub>.

#### **B. Subjek Penelitian**

Subjek penelitian ini adalah serbuk simplisia kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) yang telah diekstraksi menggunakan metode soxhletasi dan maserasi.

#### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang untuk melakukan proses identifikasi tanaman, proses ekstraksi, identifikasi metabolit sekunder, serta uji aktivitas antioksidan. Adapun waktu pelaksanaan penelitian ini yaitu Maret – Juni 2024.

#### **D. Pengumpulan Data**

##### 1) Cara pengumpulan

Pengumpulan data dilakukan dengan mengumpulkan sampel kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) matang yang sudah mencapai stadium tua ditandai dengan warna kemerahan. Sampel diperoleh dari Desa Cempaka kecamatan Sungkai Jaya Kabupaten Lampung Utara. Sampel akan melalui beberapa proses hingga menjadi simplisia kering, selanjutnya sampel dihaluskan. Sebagian serbuk simplisia akan dilakukan skrining metabolit sekunder untuk melihat kandungan alkaloid, flavonoid, tanin,

saponin, steroid dan triterpenoid. Sedangkan sisa serbuk simplisia akan melalui tahap ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode ekstraksi yaitu soxhletasi dan maserasi. selanjutnya ekstrak yang sudah kental akan dilarutkan menggunakan etanol pro analysis untuk dijadikan larutan sampel dan diuji aktivitas antioksidannya.

## 2) Alat dan Bahan

### a. Alat

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah blender, neraca analitik bel engineering , spektrofotometer Uv-Vis – 1900i with multi-cell sampel comparemen, kuvet, batang pengaduk, alumunium foil, beaker glass (100 ml), erlenmeyer (250 ml), alat Soxhlet, kompor listrik maspion, cawan porselen (125 ml ), labu ukur (20 ml, 25 ml, 50 ml, dan 100 ml), pipet volume (1,0 ml,2,0 ml,3,0 ml, 4,0 ml dan5,0 ml), gelas ukur (50 ml) corong gelas, inkubator stream series, botol kaca gelap, spatula, kertas saring, alat rotary evaporator DLAB RE100-pro, tali Kasur, tabung reaksi, rak tabung, vortex mixer VM-300p, plat tetes, buret, statif dan klem, bulb, water bath.

### b. Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), etanol 96%, asam klorida (HCl) 2N, aquadest, pereaksi mayer, pereaksi bouchardat, pereaksi dragendrof, serbuk magnesium stearat (Mg), asam klorida (HCl) pekat, amil alkohol (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O), pereaksi besi (III) klorida (FeCl<sub>3</sub>), n-heksan, asam asetat (CH<sub>3</sub>COOH), asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pekat, kristal DPPH, kuersetin.

## 3) Prosedur Kerja Penelitian

### a. Identifikasi tanaman kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.)

Rosella adalah sejenis tumbuhan herba tahunan yang dapat hidup lama, dapat tumbuh mencapai ketinggian 0,5-3 meter, biasanya tanaman ini tumbuh pada iklim tropis dan subtropis. Sekarang tanaman ini sudah tersebar di seluruh dunia identifikasi tanaman kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.):

- 1) Bagian buah
- 2) Bagian daun

- 3) Bagian bunga
- 4) Bagian kelopak

Identifikasi tanaman di lakukan di laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung untuk mengidentifikasi sampel kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.).

- b. Pembuatan simplisia kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.)  
Langkah pembuatan simplisia kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) adalah sebagai berikut: (Hayati, dkk, 2012:139) :
  1. Disiapkan Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) (Bagian kelopak) sebanyak 3 kg selanjutnya dilakukan sortasi atau pemilihan kelopak bunga rosella yang berkualitas baik.
  2. Dicuci bersih kelopak bunga rosella di air yang mengalir hingga diperkirakan kotoran (tanah, debu dan sebagainya) sudah hilang, kemudian ditiriskan.
  3. Dikeringkan kelopak bunga rosella dengan cara pengeringan secara tidak langsung (bahan baku ditutupi dengan kain hitam) di bawah sinar matahari langsung.
  4. Dilakukan sortasi kering dengan cara memilih kelopak bunga rosella yang sudah kering dari yang rusak atau terkena kotoran.
  5. Dipotong-potong menjadi bagian kecil dan diperhalus dengan cara menggunakan blender agar menjadi partikel-partikel yang lebih kecil, lalu dimasukkan kedalam wadah.

#### 4) Ekstraksi simplisia kelopak bunga rosella

##### a. Metode soxhletasi

Berdasarkan penelitian Senja dkk (2014:44) dan Istiqomah, proses pengekstraksian pengekstraksian serbuk simplisia dengan metode soxhletasi adalah sebagai berikut:

1. Sejumlah serbuk simplisia di bungkus dengan kertas saring dan di ikat menggunakan tali kasur, setelah di ikat di masukan kedalam alat soxhlet.
2. Ukur pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:16, lalu masukan kedalam labu.

3. Lakukan pemanasan dengan suhu 70°C sampai tetesan siklus tidak berwarna lagi atau kurang lebih 5 jam, di lakukan ekstraksi soxhletasi sebanyak 3x dengan 14-19 siklus.
4. Kemudian ekstrak diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 50°C.

b. Metode maserasi

Berdasarkan Marjoni (2016:41-42) proses mengekstraksi serbuk simplisia dengan metode maserasi yaitu:

- 1) Serbuk simplisia direndam menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 Perendaman dilakukan selama 5 x 24 jam dan diaduk secara berulang.
- 2) Setelah masa perendaman selesai, maserat disaring dan dipisahkan dari ampasnya.
- 3) Kemudian ekstrak diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 50 °C

c. Pemeriksaan Alkaloid

Menurut Marjoni (2016:8), pengujian alkaloid dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1) Ditimbang 0,5 gram ekstrak simplisia
- 2) Ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air suling, lalu panaskan di penangas air selama 2 menit.
- 3) Didinginkan, lalu saring filtrat yang telah tersaring akan dipakai untuk percobaan berikut:
  - a. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer Akan menghasilkan endapan putih / kuning.
  - b. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi bouchardat menghasilkan endapan coklat.
  - c. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi dragendrof menghasilkan endapan merah bata.

jika hasil endapan paling sedikit 2 -3 pereaksi maka sampel dianggap positif.

d. Pemeriksaan Flavonoid

Menurut Marjoni (2016:9), pengujian flavonoid dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1) Ditimbang 10 gram ekstrak kelopak bunga rosella, lalu tambahkan 100 mL air.
- 2) Dididihkan campuran tersebut sekitar kurang lebih 5 menit, saring filtrat dalam keadaan panas.
- 3) Dipipet 5 mL filtrat, lalu tambahkan 0,1 gram serbuk Mg stearat, 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol, lalu dikocok, biarkan lapisannya memisah.
- 4) Sampel positif mengandung flavonoid jika terbentuk lapisan amil alkohol yang berwarna merah, kuning, atau jingga.

e. Pemeriksaan fenol

Menurut (Syarif dkk., 2015, h.84).pengujian fenol dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1) Sebanyak 0,5 gram ekstrak di tambah 10 mL aquades..
- 2) Kocok perlahan dan biarkan memisah
- 3) Tambahkan pereaksi NaCl
- 4) Tambahkan 2-3 tetes pereaksi FeCl<sub>3</sub>
- 5) Fenol dianggap positif jika pada penambahan FeCl<sub>3</sub> terbentuk warna hijau,merah ungu atau hitam pekat.

f. Pemeriksaan Saponin

Menurut Marjoni (2016:12), pengujian saponin dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1) Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 10 mL air suling panas.
- 2) Didinginkan kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik.
- 3) Terbentuk buih atau busa selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10.
- 4) Tambahkan 1 tetes larutan HCl 2N, apabila buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin.

g. Pemeriksaan steroida / triterpenoida

Menurut Marjoni (2016:12), pengujian steroida/triterpenoid dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1) Sebanyak 1 gram ekstrak di tambah dengan 20 mL n-heksan selama 2 jam, lalu saring.
- 2) Filtrat diuapkan dalam cawan penguap.
- 3) Pada sisa filtrat, ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- 4) Hasil positif steroid apabila terbentuk warna biru atau hijau, sedangkan hasil positif triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna merah atau ungu.

h. Pemeriksaan tanin

Menurut Hanani (2015), pengujian tanin dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1) Sebanyak 0,5 gr ekstrak ditambah aquades sampai tidak berwarna .
- 2) Diambil 5 mL filtrat yang telah diencerkan, kemudian tambahkan 1% gelatin dalam natrium klorida 10%.
- 3) Hasil positif sampel mengandung tanin, ditunjukkan dengan endapan.

i. Pengujian aktivitas antioksidan

Berdasarkan Pindan et al (2021), Fauzi dan Santoso (2021), pengujian antioksidan dengan metode DPPH dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM
  - a) Ditimbang sebanyak 1,971 mg kristal DPPH.
  - b) Kristal DPPH dilarutkan dalam 50 mL etanol pro analysis.
  - c) Homogenkan larutan DPPH, lalu simpan dalam botol gelap.
2. Pembuatan Larutan Sampel
  - a) Ditimbang 10 mg ekstrak etanol kelopak bunga rosella
  - b) Dilarutkan dalam 50 mL pelarut etanol pro analysis.
  - c) Homogenkan sampel, lalu simpan dalam botol gelap.
  - d) Buat variasi konsentrasi ekstrak etanol kelopak bunga rosella masing-masing 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm.

- j. Pembuatan Larutan Blanko
  - a) Disiapkan tabung reaksi
  - b) Tambahkan 4-6 mL etanol pro analysis
- k. Pembuatan larutan kontrol
  - a) Disiapkan tabung reaksi.
  - b) Dipipet 1 mL larutan DPPH.
  - c) Lalu tambahkan etanol pro analysis sebanyak 4 mL, campur hingga homogen dan diinkubasi selama 30 menit
  - d) Ukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer Uv Vis dengan panjang gelombang 500 - 600 nm hingga didapatkan panjang gelombang maksimum.
- l. Pembuatan Larutan Kuersetin sebagai Pembanding

Sebanyak 2 mg larutan perbandingan dilarutkan dengan 50 mL methanol p.a dalam labu ukur 20 mL sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran dalam ukur 25 mL dengan menambahkan methanol p.a sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm.(Handayani dkk., 2018).
- m. Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH
  - a) Dipipet 4 mL dari masing-masing konsentrasi ekstrak buah kelopak bunga rosella.
  - b) Ditambahkan 1 mL larutan DPPH, lalu campur hingga homogen menggunakan bantuan vortex.
  - c) Diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap.
  - d) Amati perubahan warna yang terjadi setelah proses inkubasi.
  - e) Lalu, ukur nilai serapannya menggunakan *spektrofotometer Uv-Vis* panjang gelombang maksimum sesuai panjang gelombang sampel.
  - f) Lakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

### E. Perhitungan aktivitas antioksidan (IC50 )

Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan besarnya serapan radikal DPPH oleh sampel melalui perhitungan persentase inhibisi dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi ekstrak}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Hasil dari perhitungan persentase inhibisi dimasukkan ke dalam nilai IC50. IC50 adalah konsentrasi yang dapat meredam 50% radikal bebas sehingga Semakin kecil nilai IC50 maka semakin besar aktivitas antioksidannya. IC50 merupakan suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi larutan uji yang dapat menghasilkan hambatan radikal bebas sebesar 50% dan dapat dihitung berdasarkan persamaan garis regresi linear korelasi antara Y dengan K menggunakan rumus sebagai berikut:

$$Y = bx + a$$

Keterangan:

- Y = 50
- x = konsentrasi larutan uji (K)

Untuk memudahkan peneliti dalam membuat persamaan garis linear, peneliti akan menggunakan microsoft excel dalam pengolahan data tersebut, sehingga dapat terlihat kurva perbandingan nilai IC50 masing-masing larutan sampel.