

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Percobaan**

Rancangan penelitian dengan jenis penelitian eksperimen yang diuji secara kuantitatif, meliputi tahapan persiapan, tahapan pelaksanaan, dan tahapan akhir. Tahapan persiapan meliputi persiapan alat dan bahan yang akan digunakan dalam proses pengujian yaitu pertama determinasi tanaman rosella dan pegagan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan adalah dari tanaman yang sejenis, selanjutnya proses pembuatan simplisia kering yang kemudian dijadikan teh gansella dengan perbandingan 2:1 (rosella dan pegagan). Proses selanjutnya yaitu mengekstraksi gansella herbal tea dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol p.a dan HCl 1% dengan perbandingan volume 9:1. Hasil ekstraksi dipisahkan dengan menggunakan *Rotary evaporator*. Hasil evaporator kemudian ditentukan kadar antosianinnya dengan menggunakan metode pH diferensial menggunakan spektrofotometri Uv-Vis sekaligus penentuan panjang gelombang maksimal.

Tahap pelaksanaan pengujian yaitu penetapan formulasi dari hasil penentuan kadar antosianin yang telah diuji. Formulasi bertujuan untuk menentukan jumlah Fe yang ditambahkan untuk membentuk kompleks Fe antosianin. Formulasi dilakukan dengan 4 variasi yaitu penambahan Fe 0 ppm, *a* ppm, *b* ppm, dan *c* ppm. Pembentukan kompleks Fe-Antosianin yaitu sonikasi dengan gelombang ultrasonik.

Tahapan akhir adalah pengujian absorbansi maksimal penambahan Fe dengan berbagai konsentrasi dengan spektrofotometri UV-vis. Setelah mendapatkan absorbansi maksimal menentukan nilai  $IC_{50}$  dengan metode DPPH. Masing-masing penambahan Fe dilakukan 5 perlakuan untuk menentukan nilai  $IC_{50}$ . kemudian di uji kadar radikal bebas nya dengan spektrofotometri UV-vis. Yang terakhir dilihat peningkatan nilai  $IC_{50}$  masing-masing perlakuan dan dilihat uji beda dengan menggunakan Uji ANOVA (*Analysis Of Variance*).

#### **3.2 Populasi Dan Sampel Penelitian**

##### **3.2.1 Populasi**

Populasi dalam penelitian adalah gansella herbal tea (rosella dan pegagan).

##### **3.2.2 Sampel**

Sampel dari penelitian ini yaitu antosianin dan kompleks Fe antosianin dalam ekstrak gansella herbal tea.

### 3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Januari – Mei 2019 di Laboratorium Mikrobiologi, Kimia, Farmakognosi, Instrumen Putra Indonesia Malang.

### 3.4 Definisi Operasional Variabel

#### 3.4.1 Variabel Penelitian

Penelitian ini terdiri atas variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penambahan Fe sedangkan variabel terikatnya adalah nilai  $IC_{50}$ , disajikan pada Tabel 3.1

**Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel**

Variabel	Sub Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur/Indikator	Alat Ukur	Skala Ukur
Penentuan kadar antosianin dengan metode gradien pH	Screening Panjang gelombang	Pengukuran panjang gelombang	Nilai absorbansi maksimal	Spektrofotometri UV –vis	Absorbansi (Nominal)
	Linieritas	Pengukuran linieritas berdasarkan gradien pH	Nilai absorbansi pH 1 dan 4,5	Spektrofotometri UV –vis	Absorbansi (Nominal)
	Kadar Antosianin	Pengukuran kadar antosianin berdasar rumus Penentuan kadar antosianin	% b/b	Spektrofotometri UV -vis	% (Nominal)
Penambahan Fe pada ekstrak antosianin.	Penambahan Fe 0 ppm	Perlakuan dengan tanpa penambahan Fe untuk formulasi.	Nilai absorbansi maksimal	Spektrofotometri UV -vis	Absorbansi (Nominal)
	Penambahan Fe a ppm	Perlakuan dengan penambahan Fe a ppm untuk pembentukan kompleks Fe Antosianin dalam formulasi.	Nilai absorbansi maksimal	Spektrofotometri UV –vis	Absorbansi (Nominal)
	Penambahan Fe b ppm	Perlakuan dengan penambahan Fe b ppm untuk pembentukan kompleks Fe Antosianin dalam formulasi.	Nilai absorbansi maksimal	Spektrofotometri UV –vis	Absorbansi (Nominal)

	Penambahan Fe c ppm	Perlakuan dengan penambahan Fe c ppm untuk pembentukan kompleks Fe Antosianin dalam formulasi.	Nilai absorbansi maksimal	Spektrofotometri UV -vis	Absorbansi (Nominal)
Nilai IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	Pengukuran dan perhitungan inhibisi konsentrasi 50 % menghambat DPPH dalam konsentrasi Fe (0 ppm, a ppm, b ppm, c ppm)	Grafik % inhibisi dibandingkan dengan konsentrasi	Spektrofotometri UV -vis	IC <sub>50</sub> /ppm (Nominal)

### 3.5 Pengumpulan Data

#### 3.5.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk penelitian adalah oven, ayakan, blender, sendok, loyang, wadah gelap, timbangan, gelas ukur, sendok, aluminium foil, *Rotary vacuum evaporator*, corong gelas, *bunchner*, *beaker Glass*, *magnetis stirer*, labu takar (10, 25, 50, 100, 250, 500 mL), pipet volume (1, 2, 3, 5, 10, 15, 25 mL), timbangan analitik (ohaus), pH meter (OAKTAN), spektrofotometer Uv-vis (Genesys 10S UV-Vis), tabung reaksi, rak tabung reaksi, dan sonikator (Elma S 300H Elmasonic)

Bahan yang digunakan adalah bunga rosella, herba pegagan, aquades, etanol 96%, serbuk Kalium klorida (KCl), asam klorida (HCl) 1%, serbuk natrium asetat (CH<sub>3</sub>COONa), *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil* (DPPH) dan serbuk FeCl<sub>3</sub>.

#### 3.5.2 Prosedur Penelitian

##### 3.5.2.1 Determinasi Tanaman

1. Mencari tanaman rosella dan pegagan (tanaman utuh) di daerah Materia Medika Batu, Jawa Timur.
2. Melakukan determinasi tanaman rosella dan pegagan di LIPI Kebun Raya Purwodadi.

##### 3.5.2.2 Pembuatan Gansella Herbal Tea

1. Membuat simplisia kering kelopak bunga rosella dan pegagan.
2. Menghaluskan simplisia dengan menggunakan blender
3. Memformulasi dengan perbandingan 2:1 kelopak bunga rosella dan pegagan (400 g rosella dan 200 g pegagan)

### 3.5.2.3 Ekstraksi Gansella Herbal Tea (modifikasi dari (Kartika, 2017))

1. Menyiapkan toples untuk maserasi
2. Memasukkan gansella herbal tea ke dalam toples.
3. Memasukkan etanol p.a dan HCl 1% dengan perbandingan volume 9:1.
4. Memaserasi selama 24 jam sambil sesekali diaduk.
5. Menyaring dengan penyaring *bunchner* agar kering sempurna
6. Melakukan remaserasi hasil residu dengan menambahkan pelarut etanol p.a dan HCl 1% dengan perbandingan volume 9:1.
7. Melakukan remaserasi selama 24 jam sambil sesekali diaduk.
8. Menyaring hasil maserasi dengan *bunchner* agar kering sempurna
9. Memekatkan hasil ekstrak dengan *Rotary vacuum evaporator* dan *freeze drying*.

### 3.5.2.4 Penentuan Kadar Antosianin ( modifikasi dari (Octaviani et al., 2015))

1. Menimbang sebanyak 0,186 g KCl pada beker gelas kemudian ditambah 100 mL akuades
2. Menambahkan HCl pekat sedikit demi sedikit sehingga pH larutan menjadi pH 1.
3. Menimbang 5,443 g  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  pada beker gelas dan ditambah akuades 100 mL.
4. Menambahkan HCl 2 N sedikit demi sedikit sehingga pH larutan menjadi pH 4,5
5. Mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis.
6. Mengukur absorbansi mulai 400-700 nm untuk menentukan panjang gelombang (panjang gelombang X)
7. Menimbang  $\pm 10$  gram ekstrak dan dibuat pengenceran 1,2,4,6,dan 8%
8. Mengambil ekstrak antosianin masing-masing pengenceran sebanyak 4 mL kemudian dilarutkan dengan 6 mL larutan pH 1.
9. Mengambil ekstrak antosianin masing-masing pengenceran sebanyak 4 mL kemudian dilarutkan dengan 6 mL larutan pH 4,5.
10. Mengukur absorbansi dengan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (panjang gelombang X) yang telah dicari dan pada panjang gelombang 700 nm.
11. Menghitung kadar antosianin pada gansella herbal tea.

### 3.5.2.5 Formulasi Kompleks Fe Antosianin

1. Menimbang ekstrak  $\pm$  4 gram ad dengan aquades 100 mL konsentrasi 40.000ppm atau 4%
2. Menimbang  $\text{FeCl}_3 \pm 0,32$  gram larutkan dengan 100 mL aquades sampai tanda batas (konsentrasi 3200 ppm) diencerkan dengan seri konsentrasi 3,2 ppm, 0,032 ppm, 0,0032 ppm.
3. Memipet 7,5 mL (40.000 ppm) ekstrak dan ditambah 2,5 mL  $\text{FeCl}_3$  seri konsentrasi 3,2 ppm, 0,032 ppm, 0,0032 ppm.
4. Memipet 10 mL ekstrak gansella (sebagai kontrol negatif/ tanpa penambahan Fe)
5. Mensonikator hasil perlakuan selama 15 menit.
6. Melakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang maksimum yang telah dicari (panjang gelombang X).
7. Melihat konsentrasi yang memiliki absorbansi maksimal.

### 3.5.2.6 Penetapan Nilai $\text{IC}_{50}$ Kompleks Fe Antosianin

#### 3.5.2.6.1 Pembuatan Reagen DPPH (Anggraini, 2014)

1. Menimbang serbuk DPPH sebanyak 0,02 g.
2. Melarutkan dengan etanol di dalam labu sampai 500 ml sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,004 % atau 40 ppm.

#### 3.5.2.6.2 Baku Vitamin C

1. Menimbang  $\pm$  setara 25 mg vitamin C
2. Mengencerkan dengan aquadaes ad 100 mL (250 ppm)
3. Membuat baku kerja dengan konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 50 ppm
4. Mengambil masing-masing baku kerja 2 mL ditambah 2 mL DPPH
5. Menginkubasi selama 30 menit
6. Mengukur serapan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang X dan menghitung nilai  $\text{IC}_{50}$

#### 3.5.2.6.3 Penentuan nilai $\text{IC}_{50}$ Formulasi Fe Antosianin 0 ppm, 3,2 ppm, 0,032 ppm, 0,0032 ppm (modifikasi dari (Anggraini, 2014) )

1. Mengencerkan hasil sonikator masing-masing dengan 5 seri konsentrasi yaitu 100 ppm, 80 ppm, 60 ppm, 40 ppm, 20 ppm
2. Memipet 2 mL pada tabung reaksi masing-masing seri pengenceran dengan berbagai perlakuan

3. Menambah 2 mL DPPH
4. Menginkubasi selama 30 menit
5. Mengukur serapan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang X.
6. Menghitung nilai  $IC_{50}$

### **3.6 Analisa Data**

Penentuan kadar antosianin yang meliputi screening panjang gelombang, linieritas, dan penentuan kadar antosianin. Konsentrasi  $IC_{50}$  yang didapatkan di Uji ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% atau nilai signifikansi 0,05 untuk melihat perbedaan  $IC_{50}$  yang signifikan antara penambahan Fe 0 ppm, a ppm, b ppm, c ppm Fe.