**BAB III**

**METODE PENELITIAN**

## 3.1 Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif. Dengan tahapan pelaksanaan penelitian meliputi pengumpulan sampel, Identifikasi sampel Determinasi sampel , pengolahan sampel, pembuatan larutan bahan, skrining fitokimia, dan uji penetapan kadar Vitamin C dan aktivitas antioksidan dengan menggunakan alat Spektrofotometri UV-vis.

**3.1.1 Variabel Penelitian**

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdapat dua variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah pengujian kadar vitamin C dan antioksidan pada empat sampel yaitu (*Psidium guajava* L.) yaitu, Jambu biji Merah Besar , Jambu kristal, Jambu Merah Kecil , Jambu Putih kecil. Variabel terikat pada penelitian ini adalah dilakukan dengan uji kualitatif dan uji kuantitatif yaitu penetapan kadar vitamin C dan Aktivitas antioksidan dengan menggunakan Metode (Spektrofotometri UV-vis).

**3.1.2 Parameter Penelitian**

Parameter yang dilakukan pada panelitian ini yaitu untuk mengidentifikasi kadar vitamin C dan aktivitas antioksidan yang terdapat dalam buah jambu Biji Kristal, Jambu biji Merah Besar, Jambu Merah Kecil, Jambu Putih Kecil dengan melakukan uji skrining fitokimia, Penetapan kadar vitamin C menggunakan spektrofotometri ultraviolet, pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (2-2-Diphenyl-1-Picryhidrazyl). Kemudian dilanjutkan dengan melakukan analisis kadar dengan menggunakan metode spektrofotometri visible.

## 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

### 3.2.1 Jadwal Penelitian

Penelitian ini di laksanakan pada bulan Februari sampai dengan Juni.

### 3.2.2 Lokasi penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan pada bulan Februari sampai dengan bulan Juni 2024.

## 3.3 Alat Dan Bahan

### 3.3.1 Alat

Alat yang digunakan meliputi Spektrofotometer UV-vis (Shimadzu), dan alat-alat gelas, labu tentukur (pyrex), Gelas ukur (Iwaki), Batang pengaduk, Pipet tetes, Bola hisap, Pipet volume, Corong, Kaca arloji, Kertas saring whatman filter papers, Neraca analitik, tabung reaksi, rak tabung.

### 3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Buah Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) yang diperoleh dari pancur batu yang diperoleh dari Medan, asam askorbat, asam klorida, pereaksi bouchardat, pereaksi mayer, pereaksi dragendrof, pereaksi wagner, etanol, NaOH, HCl, kloroform, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, FeCl3, aquadest, Larutan DPPH, Metilen Biru, Benedict, metanol Pa.

## 3.4 Pembuatan Larutan Pereaksi

### 3.4.1 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2N

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat diencerkan dengan aquadest sampai 100 ml (Dirjen POM, 1995).

### 3.4.2 Larutan Pereaksi Natrium Hidroksida 2N

Sebanyak 8,001 g kristal natrium hidroksida ditimbang,kemudian dilarutkan dalam aquadest hingga 100 ml (Dirjen POM, 1995).

### 3.4.3 Larutan Pereaksi Bouchardat

Sebanyak 4 g kalium iodida ditimbang, kemudian dilarutkan dalam aquadest secukupnya, lalu ditambahkan 2 g iodida kemudian ditambahkan aquadest hingga diperoleh 100 ml (Dirjen POM, 1995).

### 3.4.4 Larutan Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 g raksa (II) klorida dilarutkan dalam aquadst hingga 60 ml. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 5g kalium iodida lalu dilarukan dalam aquadest 20 ml. Kedua larutan dicampurkan dan ditambahkan aquadest hingga diperoleh larutan 100 ml (Dirjen POM, 1995).

### 3.4.5 Larutan Pereaksi Dragendorf

Sebanyak 8g bismuth (II) nitrat dilarukan dalam 20 ml asam nitrat pekat kemudian dicampurkan dengan larutan kalium iodida sebanyak 2,72 g dalam 50 ml aquadest. Campuran didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan diencerkan dengan aquadest secukupnya hingga 100 ml (Dirjen POM, 1995).

**3.4.6 Larutan Pereaksi Molisch**

Sebanyak 3 g alfa naftol dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga diperoleh larutan 100 ml (Dirjen POM, 1995).

### 3.4.7 Pembuatan Larutan Blanko

Dipipet masing-masing 1 ml dari labu tentukur dengan berbagai tersebut dimasukkan kedalam labu tentukur 10 ml kemudian ditambahkan dengan 1,5 ml metanol, 0,1 ml alumunium klorida 10% (Yeti, 2021).

### 3.4.8 Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%

### Sebanyak 1 g besi (III) Korida dilarutkan dalam aquadest sampai 100 ml (Dirjen POM, 1995).

### 3.4.9 Larutan Perekasi Timbal (III) asetat 0,4 M

Sebanyak 15,17 timbal (III) asetat dilarutkan dalam aquadest bebas CO2 hingga 100 ml (Dirjen POM, 1995).

### 3.4.10 Larutan Pereaksi Lieberman-Bouchardat

Sebanyak 5 ml asam asetat anhidrat dicampur dengan 5 ml asam sulfat pekat, lalu ditambahkan dengan etanol hingga 50 ml (Dirjen POM, 1995).

## 3.5 Pengambilan Dan Identifikasi Sampel

### 3.5.1 Pengambilan Sampel

 Sampel Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) diambil di sembahe , brastagi market, patumbak, yang diperoleh dari Provinsi Sumatera Utara. Metode pengambilan sampel dilakukan dengan cara *Purposive sampling,* sampel diambil pada satu tempat atau daerah saja dan tidak membandingkannya dengan daerah lain.

**3.5.2 Determinasi Tumbuhan**

Determinasi tumbuhan dilakukan di *Herbarium Medanense* (MEDA) Universitas Sumatera Utara terhadap Buah Jambu Biji (*Psidium guajava* L) yang diteliti.

## 3.6 Pengolahan Sampel

Daging dan Biji jambu dimana yang digunakan untuk penentuan kadar vitamin C adalah daging dan biji jambu . kemudian di cuci bersih dan di belender, selanjutnya di lakukan Pemeriksaan golongan senyawa kimia, analisis kualitatif, dan identifikasi lanjutan untuk penetapan kadar Vitamin C dan aktivitas antioksidan dengan metode spektrofotometri UV-vis.

## 3.7 Skirining Fitokimia

### 3.7.1 Pemeriksaan Saponin

Sampel hasil perasan Berbagai Jenis buah Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) yang sudah di blender di ambil sebanyak 0,5 g dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan kocok selama 10 detik. Jika terbentuk buih setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit, dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

### 3.7.2 Pemeriksaan Tanin

Sampel hasil perasan berbagai jenis buah jambu biji *(Psidium guajava* L.) yang sudah di blender halus kemudian ditambahkan 10 ml metanol, disaring dan dibagi menjadi 2 bagian di dalam tabung reaksi, salah satu tabung reaksi ditambahkan FeCl3 sebanyak 2 tetes, diamati perubahan warna pada sampel, jika warna sampel berubah menjadi warna hijau kehitaman, ini mengindikasikan bahwa di dalam sampel tersebut mengandung senyawa tanin (Kasih, 2020.)

### 3.7.3 Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Sampel hasil perasan berbagai jenis buah jambu biji *(Psidium guajava* L.) yang sudah di blender halus di timbang 0,5 g, ditambahkan 10 ml klroform, dikocok dan disaring filtratnya, ditambahkan 10 tetes asam asetat glacial pada filtrat uji, ditambahkan 10 tetes H2SO4, kemudian diamati perubahan warna yang terjadi, Jika terbentuk warna hijau/biru kehijauan atau warna merah/merah keunguan menunjukkan adanya senyawa golongan steroid/triterpenoid (Srinengri, 2019).

### 3.7.4 Pemeriksaan Alkaloid

Sampel hasil perasan berbagai jenis buah jambu biji (*Psidium guajava* L.) ditimbang sebanyak 0,5 g, kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air suling, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring, filtrat dipakai untuk tes alkaloid sebagai berikut :

1. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapat menggumpal berwarna putih atau kuning.
2. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaski Bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.
3. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaski Dragendroff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau kekeruhan sedikitnya 2 reaksi dari 3 percobaan diatas (Depkes RI, 1995).

### 3.7.5 Pemeriksaan Glikosida

Hasil perasan ditimbang sebanyak 3 g, kemudian disari dengan 30 mL campuran 7 mL bagian etanol 96% dan 3 bagian aquadest ditambah dengan 10 ml HCL 2N. Direfluks selama 30 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 20 mL filtrat ditambahkan 25 mL aquadest dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok, lalu didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari dengan 20 mL campuran 3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol dilakukan berulang sebanyak tiga kali. Kumpulkan sari air diuapkan pada temperatur tidak lebih dari 50°C. Sisanya dilarutkan dalam 2 mL metanol. Kemudian diambil 0,1 mL larutan percobaan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, diuapkan di penangas air. Pada sisa ditambahkan 2 mL air dan 5 tetes pereaksi molish. Kemudian secara perlahan ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung, jika terbentuk cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida (Depkes, 1989).

### 3.7.6 Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 0,5 g sampel jambu biji, kemudian ditambahkan 50ml air suling panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, filtrate yang diperoleh kemudian diambil 5 ml lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Magnesium dan 1 ml Hcl pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Adanya flavonoid ditandai dengan adanya warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1995).

## 3.8 Analisa Kualitatif

### 3.8.1 Pemeriksaan Vitamin C Buah jambu biji dengan fecl3 1%

Filtrat sampel Jambu biji sebanyak 1 ml direaksikan dengan 10 NaHCO31% dan 4 ml air suling. Kandungan vitamin C dibuktikan perubahan warna ungu pada sampel.

### 3.8.2 Pemeriksaan Vitamin C Buah jambu biji dengan Metilen Blue

Sebanyak 2 mL hasil perasan jambu biji dalam tabung reaksi ditambahkan 4 tetes larutan metilen biru kemudian dihangatkan hingga 40º C. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna biru tua yang dalam waktu 3 menit berubah warna biru muda atau hilang.

### 3.8.3 Pemeriksaan Vitamin C Buah Jambu Biji dengan Benedict

Dipipet 5 ml filtrat sampel lalu dimasukkan pada tabung reaksi dan ditambahkan pereaksi Benedict sejumlah 15 tetes. Setelah itu, tabung reaksi kemudian dipanaskan diatas bunsen hingga mendidih kurang lebih sekitar 2 menit hingga didapatkan warna hijau kekuningan atau merah bata.

## 3.9 Penetapan Kadar Vitamin C dengan Metode Spektofotometri UV

### 3.9.1 Pembuatan Larutan Induk Baku Vitamin C BPF

Ditimbang dengan saksama 50 mg asam askorbat Baku Pembanding, kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 ml, dilarutkan dengan aquades, di kocok sampai larut lalu dicukupkan dengan akuades sampai garis tanda (500 μg/ml) - LIB I. Dari larutan LIB I dipipet 5 ml dimasukkan ke dalam labu tentukur 25 ml, ditambahkan dengan akuades sampai garis tanda (100 μg/ml) - LIB II(Leo, 2022).

### 3.9.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Vitamin C

Dari LIB II (100 μg/ml) dipipet 4 ml, dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 ml dan dicukupkan dengan akuades sampai garis tanda lalu dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 8 μg/ml. Kemudian larutan ini diukur absorbansinya pada panjang gelombang 200-400 nm (Leo, 2022).

### 3.9.3 Pembuatan Larutan Kurva Kalibrasi

Dipipet dari LIB II (100 μg/ml) kedalam labu ukur 10 mL masing-masing sebesar 0,06 ml, 0,1 ml, 0,14 ml, 0,18 ml, 0,2 ml (3ppm, 5 ppm, 7 ppm, 9ppm, dan 10 ppm). Kemudian ditambahkan aquades sehingga tanda batas lalu dihomogenkan dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh.(Leo, 2022).

### 3.9.4 Penentuan Kadar Tiap Sampel

Dipotong buah kecil-kecil kemudian diblender hingga halus kemudian disaring menggunakan kain planel kemudian ditimbang sebanyak 2,5gram setelah itu dimasukkan ke dalam labu 50 ml kemudian dicukupkan dengan Aquadest hingga tanda batas (50.000µg/ml), dipipet 5 ml dari Lib 1 kedalam labu 25ml dicukupkan dengan aquadest sampai tanda batas (10000 µg/ ml).

## 3.10 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode Spektrofotometri

##  Visible

### 3.10.1 Pembuatan Larutan Induk Baku DPPH

Ditimbang 10 mg DPPH larutkan dalam methanol Pa, kemudian dimasukkan kedalam labu tentukur 50 ml kemudian dilarutkan dengan metanol dan dicukupkan sampai garis tanda, hingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 200 µg/ml (Molyneux,2004).

### 3.10.2 Pembuatan Blanko

Larutan baku DPPH konsentrasi 200 µg/ml di pipet sebanyak 1 ml, kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 ml, dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda, sehingga didapat (Konsentrasi 40 µg/ml). Larutan disimpan ditempat yang terlindung dari cahaya (Molyneux, 2004).

### 3.10.3 Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH

Larutan DPPH konsentrasi 200 µg/ml di pipet sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 ml dilarutkan dengan metanol dan dicukupkan sampai tanda batas (konsentrasi 40 µg/ml), lalu dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur sarapannya pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-visible (Molyneux, 2004).

### 3.10.4 Penentuan OperatingTime

Larutan DPPH konsentrasi 200 µg/ml di pipet sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 ml dilarutkan dengan metanol dan dicukupkan sampai 30 tanda batas (konsentrasi µg/ml), kemudian larutan diukur absorbansinya tiap menit pada panjang gelombang maksimum selama 60 menit hingga memperoleh absorbansi yang stabil (Molyneux, 2004).

###  3.10.5 Penentuan Aktivitas Antioksidan Pada Sampel

Ditimbang sampel sebanyak 2,5g dimasukkan kedalam labu 50ml dicukupkan methanol Pa sampai tanda batas (konsentrasi 50000 µg / ml ) – LIB I. Dipipet 5ml larutan di Dipipet larutan sari jambu masing masing sebanyak 0,5ml, 1ml, 1,5 ml, 2ml 2,5ml dimasukkan ke dalam labu tentukur 5ml. kedalam masing masing labu tentukur di tambahkan 1ml larutan DPPH konsentrasi 200µg/ml lalu dicukupkan dengan methanol Pa sampai garis tanda diperoleh konsentrasi larutan uji (1000 ppm, 2000ppm, 3000ppm, 4000ppm, 5000ppm). kemudian diukur absorbansinya pada Panjang gelombang maksimum 515nm. dilakukan sebanyak enam kali pengulangan.

**3.10.6 Pengukuran Absorbansi DPPH Setelah Penambahan Vitamin C**

Ditimbang sebanyak 10mg vitamin C kemudian dilarutkan dengan metanol dalam labu tentukur 50ml. Volumenya dicukupkan dengan methanol sampai garis tanda (10000µg/ml). kemudian dipipet larutan 0,025ml, 0,05ml, 0,075ml, 0,1ml, 0,125ml dimasukkan kedalam labu tentukur 5ml lalu di tambahkan 1ml larutan DPPH (konsentrasi 40µg/ml) Konsentrasi vitamin C 1ppm, 2ppm, 3ppm, 4 ppm, 5ppm. Kemudian diukur absorbansinya pada Panjang gelombang maksimum 515nm dan pengukuran dilakukan sebanyak enam kali pengulangan.

### 3.10.7 Penentuan Persen Peredeman

Kemampuan antioksidan diukur sebagai penurunan serapan larutan DPPH (perendaman warna ungu DPPH) akibat adanya penambahan larutan uji. Nilai serapan larutan DPPH sebelum dan sesudah penambahan larutan uji tersebut dihitung sebagai peredaman

$$\% peredaman=\frac{A Kontrol - A Sampel}{A kontrol}$$

Keterangan :

A Kontrol : Absorbansi Tidak Mengandung Sampel A

Sampel : Absorbansi Mengandung Sampel

Selanjutnya hasil perhitungan persen peredaman yang diperoleh dilakukan perhitungan persamaan garis regresi dengan konsentrasi sampel (ppm) sebagai absis (sumbu x) dan nilai peredaman sebagai koordinatnya (sumbu y) maka diperoleh persamaan garis regresi yang selanjutnya dapat dihitung kemampuan bahan uji sebagai antioksidan dengan menghitung 𝐼𝐶50 mengandung rumus sebagai berikut.

50 = ax + b

Keterangan :

50 : Kemampuan antioksidan menghambat 50% aktivitas radikal bebas

a : Slope

b : Intercept

 x : Konsentrasi (Molyneux,2004)

### 3.10.8 Penentuan Nilai 𝑰𝑪𝟓𝟎 Antioksidan

Nilai IC50 merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50% (mampu menghambat peredaman proses oksidasi sebesar 50%). Jika nilai aktivitas antioksidan 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antioksidan sedangkan nilai 100% berarti peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya. Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi sampel (µg/ml) sebagai absis (sumbu y) dan nilai % peredaman (antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu y) (Molyneux, 2004).