

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dan dirancang dengan metode eksperimental di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Ekstrak dari tanaman bandotan dan tempuyung di ekstraksi dengan etanol 70% menggunakan metode ekstraksi maserasi. Ekstrak yang telah didapat kemudian dianalisis fitokimia untuk diuji menggunakan instrument Spektrofotometri *UV-Visible*.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan yaitu tanaman bandotan dan tempuyung yang diambil dari Kebun Percobaan Manoko Lembang.

3.3 Bahan dan Alat yang digunakan

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi simplisia bandotan dan tempuyung, etanol 70%, HCl, amil alkohol p.a (Merck), serbuk Mg p.a (Merck), $AlCl_3$ p.a (Merck), CH_3COOH p.a (Merck), aquadest, kuersetin p.a (Sigma Aldrich), pereaksi mayer, pereaksi dragendroff, pereaksi lieberman Burchard, gelatin, $FeCl_3$ p.a (Merck), KOH, eter (Merck), H_2SO_4 (Merck), kertas saring, etanol p.a (Merck), aluminium foil, blue tip (Nesco).

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Rotary Evaporator* (EYELA), neraca analitik digital (Shimadzi), labu ukur (Iwaki), corong, gelas

ukur (Pyrex), tabung reaksi (Maspion), blender (Maspion) batang pengaduk, pipet volume, pipet tetes, spatula, mikropipet, kuvet, instrument spektrofotometer *UV-Visible* (Termo Scientific), komputer (LG).

3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Riset Universitas Buana Perjuangan Karawang yang berlokasi di Kabupaten Karawang, Jawa Barat pada bulan November 2021 - Februari 2022.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu ekstrak bandotan dan tempuyung.

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu kadar flavonoid total ekstrak bandotan dan tempuyung dengan metode spektrofotometri *UV-Visible*.

3.6 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sumber Tanaman Uji

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu simplisia herba bandotan (*Ageratum conyzoides*) dan tempuyung (*Sonchus arvensis*) yang diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko Lembang, Jawa Barat.

3.6.2 Determinasi Tanaman

Determinasi atau penentuan tanaman digunakan untuk menentukan identitas sebenarnya dari suatu tanaman tersebut serta dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Tumbuhan bandotan (*Ageratum conyzoides*) dan tempuyung

(*Sonchus arvensis*) di determinasi di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Kota Malang.

3.6.3 Proses Ekstraksi

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu simplisia herba bandotan dan tempuyung yang diperoleh dari kebun percobaan manoko lembang. Hal pertama yang dilakukan dalam proses ekstraksi yaitu sortasi basah untuk memisahkan sampel dari kotoran-kotoran seperti tanah, kerikil, rumput dll, selanjutnya dilakukan perajangan dengan tujuan untuk mempermudah proses pengeringan, kemudian dilakukan pengeringan sampel yang dilakukan dengan cara dianginkan agar tidak merusak senyawa aktif pada sampel. Sampel yang telah kering dihaluskan dengan menggunakan blender, kemudian ambil 300 g bubuk simplisia herba bandotan dan tempuyung di maserasi hingga 1500 mL dengan pelarut etanol 70%, tutup maserator dengan aluminium foil dan simpan ditempat yang tidak terpapar cahaya matahari. Proses maserasi berlangsung selama tiga hari disertai pengadukan secara berulang tiap 1 hari sekali kemudian ekstrak cair ditampung, Lalu filtrat yang diperoleh diuapkan dengan alat *Rotary Evaporator* hingga menjadi ekstrak kental.

3.6.4 Pemeriksaan Ekstrak

1. Rendemen

Rendemen adalah perbandingan antara berat ekstrak dengan berat simplisia yang dihasilkan. Kandungan bioaktif ekstrak tanaman terkait dengan produksi; semakin besar hasil yang dihasilkan, semakin tinggi kandungan bahan kimia yang tertarik pada bahan baku (Dewatisari *et al.*, 2018).

Rumus berikut dapat digunakan untuk menghitung persentase nilai rendemen:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot total ekstrak}}{\text{Bobot serbuk simplisia}} \times 100\%$$

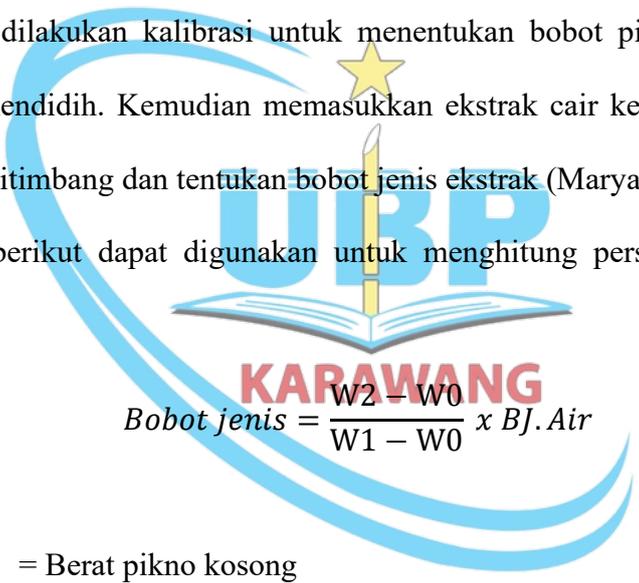
2. Organoleptik

Uji organoleptik ekstrak bertujuan untuk mengetahui identitas ekstrak tanaman, seperti bentuk, rasa, bau dan warna.

3. Bobot Jenis

Bobot jenis dilakukan dengan menimbang piknometer kosong dan kering. Selanjutnya, dilakukan kalibrasi untuk menentukan bobot pikno dan bobot air yang telah mendidih. Kemudian memasukkan ekstrak cair ke dalam piknometer kosong lalu ditimbang dan tentukan bobot jenis ekstrak (Maryam *et al.*, 2020)

Rumus berikut dapat digunakan untuk menghitung persentase nilai bobot jenis:


$$\text{Bobot jenis} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times \text{BJ. Air}$$

Keterangan:

- W_0 = Berat pikno kosong
- W_1 = Berat pikno + air
- W_2 = Berat pikno + ekstrak
- BJ. Air = 1 gr/mL

4. Skrining Fitokimia

a) Uji Alkaloid

Ekstrak dilarutkan dalam larutan HCl 2N 5 mL, yang kemudian dibagi menjadi tiga tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai blanko, tabung kedua dimasukan tiga tetes reagen mayer, dan tabung terakhir berisi

tiga tetes reagen dragendroff. Jika endapan putih kekuningan terbentuk pada tabung kedua dan endapan oranye terbentuk pada tabung ketiga, ekstrak dikatakan mengandung alkaloid.

b) Uji Flavonoid

Ekstrak ditambahkan aquadest 5 mL kemudian dipanaskan, lalu disaring untuk menghasilkan filtrat. Filtrat ditambahkan serbuk Mg, 5 mL HCl dan amil alkohol. Jika ekstrak terdapat warna hijau kekuningan atau hijau kehitaman hal tersebut dianggap flavonoid-positif.

c) Uji Saponin

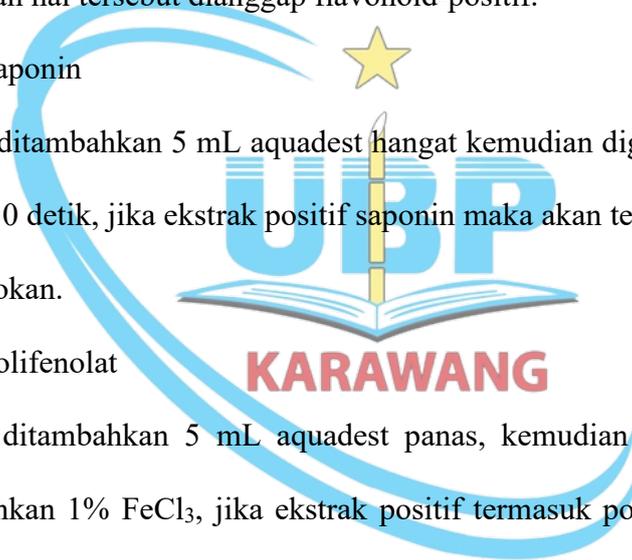
Ekstrak ditambahkan 5 mL aquadest hangat kemudian digojok secara vertikal selama 10 detik, jika ekstrak positif saponin maka akan terbentuk busa setelah penggojokan.

d) Uji Polifenolat

Ekstrak ditambahkan 5 mL aquadest panas, kemudian disaring dan filtrat ditambahkan 1% FeCl_3 , jika ekstrak positif termasuk polifenolat maka akan berubah menjadi biru kehitaman.

e) Uji Tanin

Ekstrak ditambahkan aquadest panas, kemudian disaring dan filtrat ditambahkan sedikit gelatin. Jika ekstrak positif mengandung tannin akan berubah warna menjadi keruh atau endapan putih pada larutan.



f) Uji kuinon

Ekstrak ditambahkan aquades panas kemudian disaring dan filtrat ditambahkan KOH 5%, jika warna berubah dari kuning menjadi merah, ekstrak dikatakan positif kuinon.

g) Uji Mono dan Sesquiterpenoid

1gram ekstrak ditambahkan eter dan digerus kemudian filtrat dipipet dipindahkan dalam cawan penguap, lalu setelah meguap ditambahkan Vanilin 1% dan asam sulfat pekat, ekstrak dikatakan positif jika terdapat perubahan warna

h) Uji Triterpenoid dan Steroid

1 gram ekstrak ditambahkan eter dan digerus kemudian filtrat dipipet dipindahkan dalam cawan penguap, lalu setelah meguap ditambahkan pereaksi libermann, jika terjadi perubahan warna menjadi biru atau hijau maka ekstrak dikatakan positif tritepenoid dan steroid.

3.6.5 Pembuatan Reagen

1. Pembuatan Larutan AlCl_3 10%

Sebanyak 1 g serbuk AlCl_3 10% ditimbang dan ditempatkan di beaker glass, kemudian dilarutkan dengan sebagian aquadest sampai larut. Masukkan ke dalam labu berukuran 10 mL dan tambahkan aquadest hingga tanda batas (Kementerian Kesehatan RI, 1995).

2. Pembuatan Asam Asetat 5%

Asam asetat 5% diukur sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam beaker glass kemudian dilarutkan dengan aquadest sampai benar-benar larut. Lalu

masukkan ke dalam labu ukur berukuran 100 mL dan tambahkan aquadest hingga tanda batas (Depkes RI,1995).

3.6.6 Penetapan Larutan Baku Kuersetin

1. Pembuatan larutan baku kuersetin

Persiapan larutan induk kuersetin 100 ppm, timbang sebanyak 10 mg kuersetin dan dilarutkan dalam etanol 70% hingga 100 mL (Asmorowati & Lindawati, 2019).

2. Pembuatan Larutan Seri Baku Kuersetin

Pada pembuatan larutan seri untuk mendapatkan konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm, maka dibuatlah sebanyak 2, 4, 6, 8, dan 10 mL larutan induk kuersetin 100 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur dan masing-masing dicampur dengan etanol 70% hingga 10 mL (Asmorowati & Lindawati, 2019).

3. Penentuan Panjang Gelombang maksimum (λ maks) kuersetin

Sebanyak 1 mL larutan baku kuersetin 100 ppm diambil dan dicampur dengan 1 mL $AlCl_3$ 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Larutan diukur dengan Spektrofotometer *UV-Visible* untuk menentukan panjang gelombang maksimum larutan (Syamsul *et al.*, 2019).

4. Penentuan *Operating Time* Kuersetin

Sebanyak 1 mL Larutan baku kerja kuersetin 100 ppm dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan dengan 1 mL $AlCl_3$ 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Kemudian larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum teoritis 415 nm (Ipandi *et al.*, 2016) dengan interval 2 menit selama 60

menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (A. K. Sari & Noverda Ayuhecacia, 2017).

5. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Pada pembuatan kurva baku, larutan seri 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm, diambil masing-masing 1 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL lalu direaksikan dengan 1 mL AlCl₃ 10% dan 8 mL asam asetat 5% Kemudian larutan didiamkan selama *operating time* lalu di ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri *UV-Visible* pada panjang gelombang maksimum (Syamsul *et al*, 2019).

3.6.7 Penetapan Kadar Flavonoid Total

Larutan sampel 1000 ppm masing-masing dipipet sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 1 mL AlCl₃ 10% dan 8 mL asam asetat 5% kedalam labu ukur 10 mL. Lalu larutan didiamkan selama *operating time* dan dianalisis menggunakan spektrofotometer *UV-Visible* dengan panjang gelombang maksimum (Syamsul *et al.*, 2019).

Hasil serapan dengan menggunakan spektrofotometer *UV-Visible* dihitung kadar flavonoid dengan rumus:

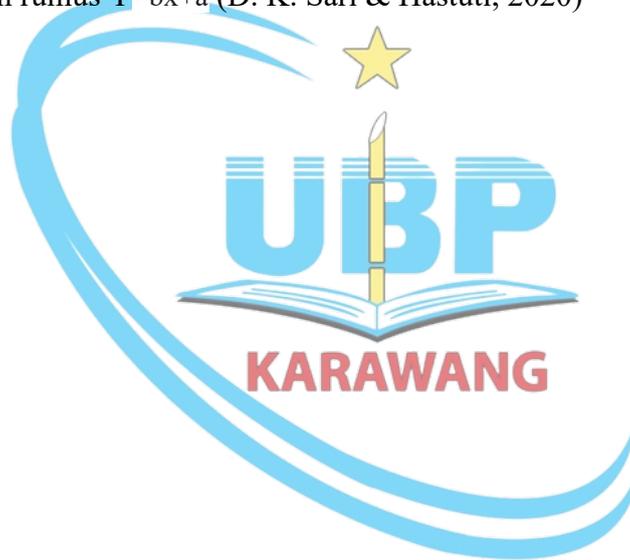
$$\% \text{ Kadar Flavonoid} = \frac{C \times V \times Fp \times 10^{-3}}{m} \times 100\%$$

Keterangan:

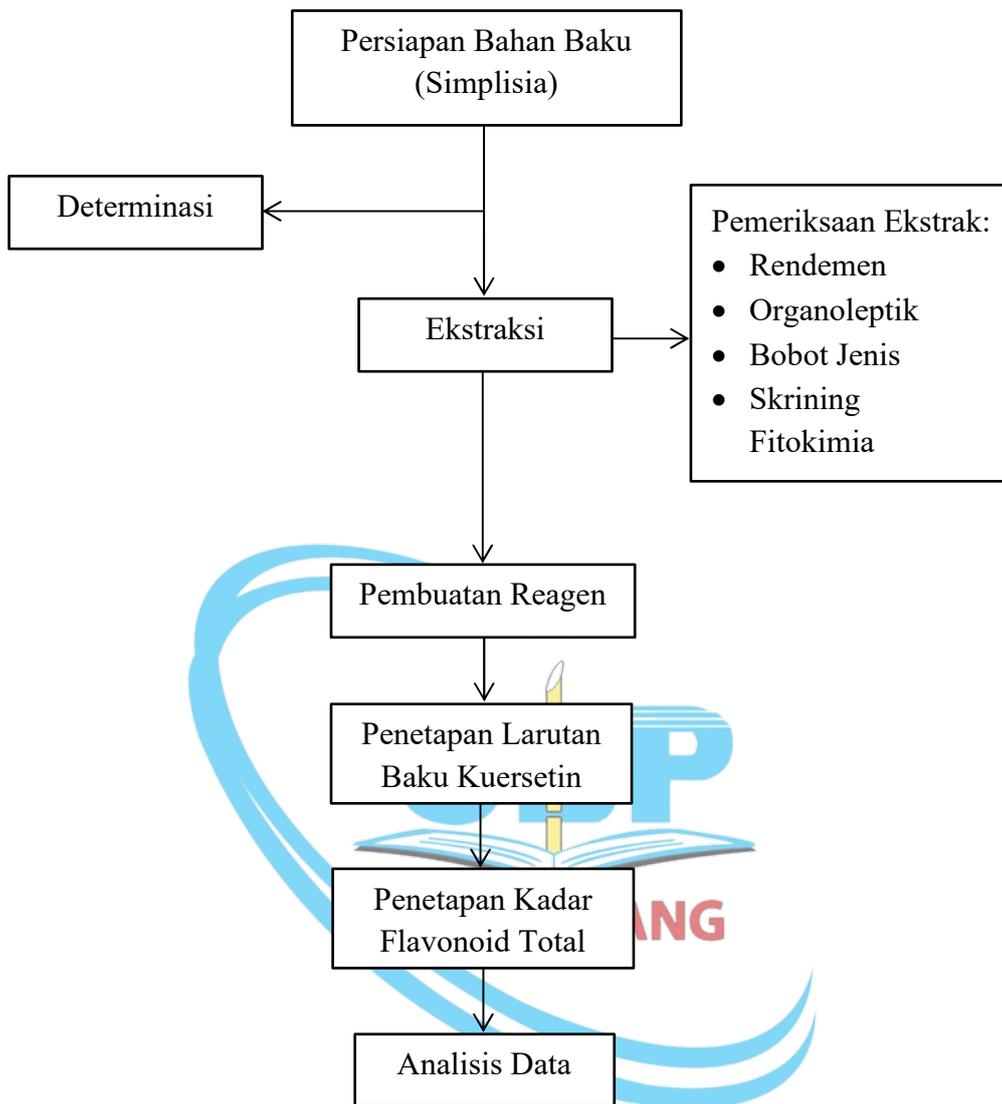
- C = Kesetaraan kuersetin (mg/L)
- V = Volume total ekstrak (mL)
- Fp = Faktor Pengenceran
- m = Berat sampel (mg) (Syamsul *et al.*, 2019)

3.7 Analisis Data

Metode analisis data yang digunakan adalah analisis data presentif dan analisis data statistik menggunakan metode *Independent Sample T-Test*. Pada data kalibrasi diperoleh nilai a, b, dan r dapat dihitung dengan regresi linier. Agar kurva yang dihasilkan linier, nilai r harus mendekati 1. Nilai r yang sangat baik adalah 0,999, menunjukkan hubungan yang kuat antara dua variabel, variabel X sebagai konsentrasi dan variabel Y sebagai absorbansi. Setelah itu diolah menggunakan rumus $Y=bx+a$ (D. K. Sari & Hastuti, 2020)



3.8 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian