

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental di Laboratorium Universitas Buana Perjuangan Karawang. Rangkaian penelitian meliputi ekstrak yang digunakan merupakan tanaman sintrong dan jombang yang telah diekstraksi dengan menggunakan etanol 70% dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi. Ekstrak kemudian analisis fitokimia untuk nantinya diuji menggunakan instrumen Spektrofotometri *UV-Vis*

3.2 Populasi Sample Tanaman Uji

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tanaman Jombang dan Sintrong yang diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko Lembang

3.3 Alat dan Bahan yang Digunakan

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain simplisia sintrong, simplisia jombang, etanol 70%, serbuk magnesium, HCl, amil alkohol, kuersetin, AlCl_3 , asam asetat, aquadest, pereaksi mayer, pereaksi dragendroff, aquadest, gelatin, FeCl_3 , KOH, eter, vanillin, asam sulfat pekat, pereaksi liebermann buchard, tisu, kertas saring, blue tip dan aluminium foil

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain rotavapor (EYELA), maserator, neraca analitik digital (Shimadzi), blender (Maspion), labu ukur (Iwaki),

penangas listrik (Maspion), penjepit kayu, tabung reaksi (Iwaki), spatula, batang pengaduk, pipet tetes, pipet volume, mikro pipet, kaca arloji, corong kaca, gelas ukur (Pyrex), Kuvet, seperangkat computer (LG) dan seperangkat instrumen Spektrofotometer *UV-Visible* (Thermo Sci)

3.4 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Universitas Buana Perjuangan Karawang pada bulan Desember 2021 hingga Februari 2022

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel independen dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% sintrong dan ekstrak etanol jombang yang dimaserasi dalam suhu ruang

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah kadar flavonoid simplisia yang sebelumnya telah diekstraksi

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Simplisia Tanaman Uji

Sampel berupa tanaman Sintrong dan Jombang yang diambil dari satu kebun dataran tinggi di Pulau Jawa di bawah pengelolaan Balai Pertanian Tanaman Rempah dan Obat bogor (Balittro) yakni Taman Kebun Percobaan Jalan Manoko Lembang Bandung. Selanjutnya dilakukan proses determinasi guna memastikan kebenaran tanaman yang digunakan, proses ini dilakukan di LIPI Biologi Cibinong.

3.6.2 Proses Ekstraksi

Serbuk simplisia sintrong dan simplisia jombang diekstraksi menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi dengan perbandingan 1:5, yaitu 300 g simplisia dan 1,5 liter pelarut sehingga mendapatkan hasil ekstrak cair. Ekstrak cair dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghasilkan ekstrak kental. Residu sisa ekstraksi kemudian dilarutkan replikasi ekstraksi kembali dengan pelarut

3.6.3 Pemeriksaan Ekstrak

1. Rendemen

Rendemen adalah suatu perbandingan antara berat ekstrak kental yang dihasilkan dengan berat simplisia kering (Pasilala, 2016). Menurut Dewatisari (2018), rendemen berkaitan dengan jumlah kandungan bioaktif yang tersaring atau yang terkandung dalam tanaman tersebut, semakin tinggi angka rendemen yang dihasilkan maka semakin tinggi pula kandungan senyawa yang tertarik pada bahan baku tersebut.

2. Organoleptik

Pemeriksaan organoleptik ekstrak bertujuan untuk mengetahui karakteristik fisik suatu ekstrak tanaman, khususnya bentuk, bau dan warna.

3. Bobot Jenis

Bobot jenis ekstrak ditetapkan dengan penimbangan piknometer kosong, piknometer berisi aquadest dan piknometer kosong berisi ekstrak kemudian ditimbang dan ditentukan nilai bobot jenis (Sari dan hastuti, 2020).

4. Skrining Fitokimia

a) Uji Alkaloid

1 g Ekstrak dilarutkan dengan 5 mL larutan HCl 2N dibagi menjadi tiga ke dalam tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai blanko, tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi mayer dan tabung terakhir di tetesi 3 tetes pereaksi dragendroff. Ekstrak mengandung alkaloid jika terbentuk endapan putih hingga kekuningan pada tabung kedua dan endapan jingga pada tabung ketiga

b) Uji Flavonoid

1 g Ekstrak ditambahkan aquadest 5 mL kemudian dipanaskan, lalu disaring untuk menghasilkan filtrat. Filtrat ditambahkan serbuk Mg, 5 mL HCl dan amil alkohol. Ekstrak positif flavonoid jika terbentuknya warna hijau kekuningan atau hijau kehitaman

c) Uji Saponin

1 g Ekstrak ditambahkan 5 mL aquadest hangat lalu digojok secara vertikal selama 10 detik, jika ekstrak positif mengandung saponin maka akan terdapat busa setelah penggojokan.

d) Uji Polifenolat

1 g Ekstrak ditambahkan 5 mL aquadest panas, kemudian disaring dan filtrat ditambahkan FeCl 1%, jika ekstrak positif mengandung polifenolat maka larutan akan berubah warna menjadi biru kehitaman

e) Uji Tanin

1 g Ekstrak ditambahkan aquadest panas, kemudian disaring dan filtrat ditambahkan sedikit gelatin. Jika ekstrak positif mengandung tanin maka akan terjadi perubahan warna menjadi keruh atau endapan putih pada larutan

f) Uji kuinon

1 g Ekstrak ditambahkan aquades panas kemudian disaring dan filtrat ditambahkan KOH 5%, jika terjadi perubahan warna kuning hingga merah maka ekstrak dikatakan positif kuinon

g) Uji Mono dan Sesquiterpenoid

1 g 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 g ekstrak ditambahkan eter dan digerus kemudian filtrat dipipet dipindahkan dalam cawan penguap, lalu setelah meguap ditambahkan pereaksi lieberman buchard, jika terjadi perubahan warna menjadi biru atau hijau maka ekstrak dikatakan positif tritepenoid dan steroid (Purianti dan Ika, 2013)

3.6.4 Pembuatan Reagen untuk Penetapan Kadar Flavonoid Total

1. Pembuatan Larutan AlCl_3 10%

1 g serbuk AlCl_3 dilarutkan dalam *beaker glass* dengan sedikit aquadest sampai larut sempurna. Masukkan ke dalam labu ukur 10 ml, dan tambahkan aquadest hingga tanda (Depkes RI, 1995).

2. Pembuatan Asam Asetat 5%

Larutkan 5 ml Asam Asetat dalam sedikit aquadest hingga homogen. Masukkan ke dalam labu ukur 100 ml, dan tambahkan aquadest hingga batas tanda (Depkes RI, 1995).

3.6.5 Penetapan Baku Standar Kuersetin

1. Pembuatan Larutan baku Kuersetin

Preparasi larutan induk kuersetin 100 ppm. Sebanyak 10,0 serbuk kuersetin dilarutkan dengan etanol 70% ad 100 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm (Asmorowati dan Lindawati, 2019)

2. Pembuatan Larutan Seri Baku Kuersetin

Sebanyak 2, 4, 6, 8 dan 10 ml larutan induk kuersetin 100 ppm dimasukkan kedalam labu ukur untuk masing masing ditambahkan dengan etanol 70% hingga 10 ml untuk mendapatkan konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm (Asmorowati dan Lindawati, 2019)

3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

1 ml larutan induk kuersetin 100 ppm direaksikan dengan 1 ml AlCl_3 10% dalam labu ukur 10 ml yang telah terisi 8 ml asam asetat 5%. Larutan diukur panjang gelombang maksimumnya dengan menggunakan Spektrofotometer *UV-Visible* (Syamsul et al, 2019)

4. Penentuan *Operating Time* Kuersetin

1 ml larutan kuersetin 100 ppm direaksikan dengan 1 ml AlCl_3 10% dan ditambahkan 8 ml asam asetat 5% kedalam labu ukur 10 ml. Absorbansi larutan dibaca pada panjang gelombang maksimal dengan interval waktu 2 menit selama 60 menit dan diamati nilai absorbansi stabilnya (Sari dan hastuti, 2020)

5. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan seri dengan kadar sebesar 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm, masing masing larutan seri baku kuersetin dipipet 1 mL lalu direaksikan dengan 1 ml AlCl_3 10% dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan 8 ml asam asetat 5% kemudian digojok hingga homogen. Larutan didiamkan selama *operating time* lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh (Asmorowati dan Lindawati, 2019)

3.6.6 Penetapan Kadar Flavonoid Total

Larutan sample 1000 ppm masing masing dipipet 1 mL untuk ditambahkan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml asam asetat 5% kedalam labu ukur 10 mL. Larutan sample didiamkan selama *operating time* dan dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer *UV-vis* dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Syamsul et al, 2019)

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

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

Keterangan :

C = Nilai kesetaraan kuersetin (mg/L)

V = Volume ekstrak (mL)

Fp = Faktor Pengenceran

m = Berat sample (mg) (Syamsul et al, 2019)

3.6.7 Analisis Data

Data yang dihasilkan kemudian dianalisis dengan menggunakan analisa data presentif dan analisis data statistika dengan menggunakan uji statistik dengan metode *Independent Sample T-test*. Dari data kurva kalibrasi dapat diperoleh nilai a, b, dan r dengan menggunakan regresi linier. Nilai r harus mendekati ± 1 agar kurva yang dihasilkan linier r yang baik yaitu 0,999 yang artinya korelasi yang kuat diantara dua variable yaitu variabel X sebagai konsentrasi dan variabel Y sebagai absorbansi.

Setelah itu diolah menggunakan rumus : $Y = bx + a$ (Sari dan hastuti, 2020)