

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis Penelitian ini tergolong kedalam jenis penelitian kuantitatif dengan metode eksperimental. Rancangan pada penelitian ini dilakukan dengan menganalisis kadar flavonoid total ekstrak tapak liman dan sambung nyawa yang sebelumnya dilakukan proses determinasi terlebih dahulu pada kedua tanaman tersebut untuk mengetahui secara pasti jenis dari tanaman yang akan digunakan pada penelitian.

3.2 Populasi Sampel Tanaman Uji

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan ekstrak tanaman tapak liman dan sambung nyawa herba yang diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko Lembang.

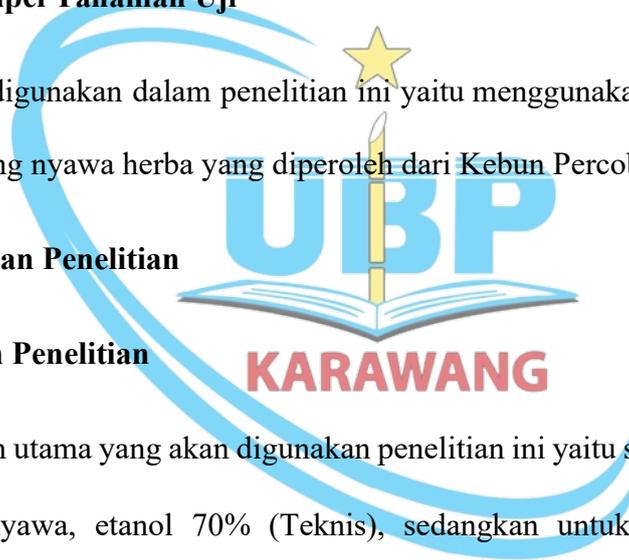
3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Bahan Penelitian

Bahan utama yang akan digunakan penelitian ini yaitu simplisia tapak liman dan sambung nyawa, etanol 70% (Teknis), sedangkan untuk bahan tambahan yang digunakan yaitu larutan aquadest, $AlCl_3$, Asam asetat, tisu, serbuk magnesium, amil alkohol, HCl, kuersetin, pereaksi mayer, pereaksi dragendroff, gelatin, $FeCl_3$, KOH, eter, vanillin, asam sulfat pekat, etanol p.a, pereaksi libermann, n-butanol, kertas whattman no 1, kertas saring, pipa kapiler dan aluminium foil.

3.3.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *rotary evaporator* (EYELA), neraca analitik digital (Shimadzi), labu ukur (Iwaki), penangas listrik (Maspion), penjepit kayu, tabung reaksi (Iwaki), spatula, batang pengaduk, pipet tetes, pipet volume, mikro pipet, kaca arloji, corong kaca, kuvet, gelas ukur (Pyrex),



seperangkat komputer (LG), dan seperangkat instrument spektrofotometer *Uv-Visible* (Termo Scientific).

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Universitas Buana Perjuangan Karawang yang berlokasi di Jl. HS Ronggo Waluyo Sirnabaya Puseurjaya, Karawang Telukjambe Timur, Kabupaten Karawang, Jawa Barat pada bulan Desember sampai Februari 2022.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Independen

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol dari tapak liman dan sambung nyawa.

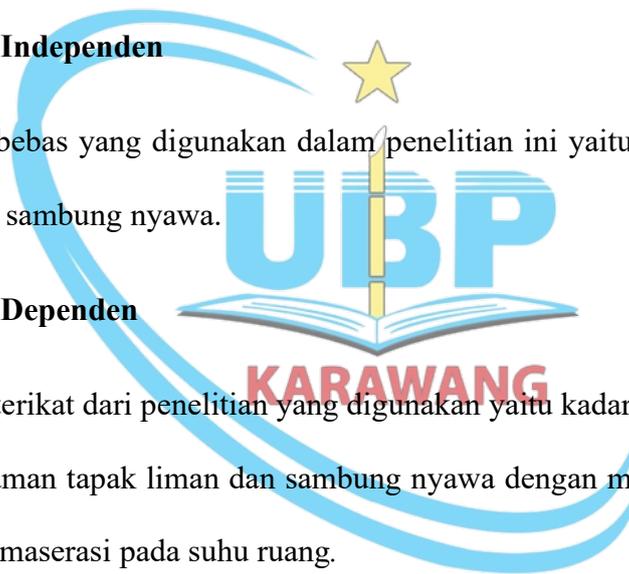
3.5.2 Variabel Dependen

Variabel terikat dari penelitian yang digunakan yaitu kadar flavonoid total ekstrak etanol 70% tanaman tapak liman dan sambung nyawa dengan metode spektrofotometri *UV-Vis* yang di maserasi pada suhu ruang.

3.6 Prosedur Percobaan

3.6.1 Sampel Tanaman Uji

Sampel tumbuhan tapak liman (*Elephantopus scaber*) dan sambung nyawa (*Gynura procumbens*). Diambil di Jl. Manoko, Cikahuripan, Lembang, Kabupaten Bandung Barat, Jawa Barat.



3.6.2 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman ini adalah untuk mengetahui adanya kebenaran identitas dari tanaman dan memastikan bahwa tanaman ini benar yang diinginkan atau tidak. Dengan demikian ini untuk terjadinya kesalahan didalam pengumpulan bahan tersebut yang akan diteliti dapat dihindari. Tanaman Tapak liman (*Elephantopus scaber*) dan sambung nyawa (*Gynura procumbens*) yang digunakan untuk penelitian ini akan di determinasi di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu Jl. Kolonel Sugiono 457-459 Kota Malang.

3.6.3 Proses Ekstraksi

Ambil 300 gram bubuk serbuk simplisia herba tapak liman dan sambung nyawa, kemudian di maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1500 mL lalu tutup maserator dengan aluminium foil dan simpan di tempat yang tidak terpapar cahaya matahari. Maserasi dilakukan selama 3 hari disertai dengan pengadukan secara berulang setiap 1 hari sekali sehingga mendapatkan hasil ekstrak cair. Lalu ekstrak cair dipekatkan menggunakan *Rotary Evaporator* sehingga menjadi ekstrak kental.

3.6.4 Pemeriksaan Ekstrak

1. Rendemen

Rendemen adalah suatu perbandingan antara berat produk kering yang akan dihasilkan dengan bahan baku. Rendemen ini dapat berkaitan dengan jumlah kandungan bioaktif yang tersaring atau yang terkandung dalam tumbuhan tersebut, semakin tinggi angka rendemen yang dihasilkan maka akan semakin tinggi pula kandungan senyawa yang tertarik pada bahan baku tersebut (Dewatisari *et al.*, 2018).

2. Organoleptik

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

3. Bobot Jenis

Bobot jenis dilakukan dengan penimbangan piknometer volume tertentu dalam keadaan kosong, selanjutnya piknometer diisi penuh dengan air untuk menentukan bobot pikno, kemudian piknometer kosong diisi menggunakan ekstrak lalu ditimbang dan ditentukan bobot jenis dari ekstrak tersebut (Sari dan hastuti, 2020).

4. Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dalam penelitian ini dilajukan dengan menyiapkan 300 gram serbuk simplisia untuk ditimbang. Serbuk tersebut dilarutkan dengan 5 mL larutan HCl 2N kemudian dibagi menjadi tiga kedalam tabung reaksi. Untuk tabung reaksi pertama digunakan sebagai blanko, lalu pada tabung reaksi kedua tambahkan 3 tetes pereaksi mayer dan tabung reaksi terakhir ditambahkan 3 tetes pereaksi dragendroff. Ekstrak dikatakan mengandung alkaloid jika terdapat endapan berwarna putih hingga kekuningan pada tabung reaksi kedua dan endapan jingga pada tabung ketiga.

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. Ekstrak dikatakan positif flavonoid jika terbentuknya warna hijau kekuningan atau hijau kehitaman.

c. Uji Saponin

Ekstrak ditambahkan 5 mL dengan aquadest hangat lalu dikocok secara vertikal selama 10 detik, jika pada ekstrak positif mengandung saponin maka akan terdapat busa setelah pengkocokan.

d. Uji Polifenolat

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

e. Uji Tanin

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

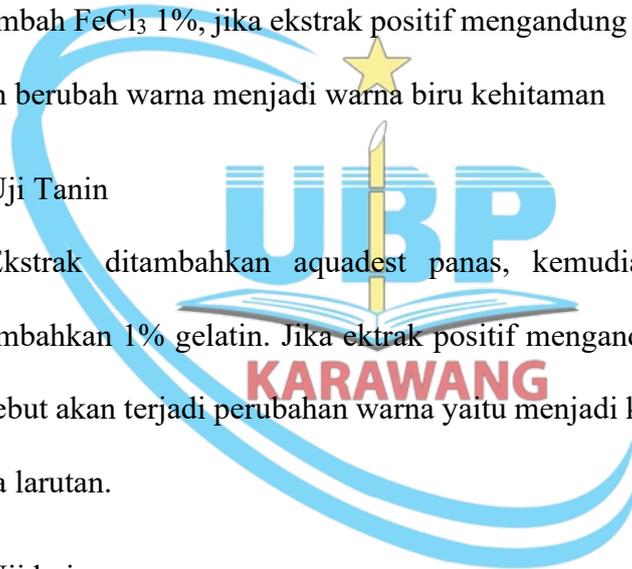
f. Uji kuinon

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 gram ekstrak ditambahkan eter dan digerus kemudian filtrat dipipet dipindahkan dalam cawan penguap, lalu setelah menguap 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 menguap ditambahkan pereaksi libermann, jika terdapat perubahan warna pada ekstrak menjadi biru atau hijau maka ekstrak dikatakan positif triterpenoid dan steroid.

3.6.5 Pembuatan Reagen untuk Penetapan Kadar Flavonoid Total

1. Pembuatan Larutan AlCl_3 10%

Timbang serbuk AlCl_3 sebanyak 1 g dan masukan kedalam *beaker glass* kemudian larutkan menggunakan aquadest hingga larut dengan sempurna, kemudian dimasukan kedalam labu ukur 10 mL lalu tambahkan aquadest sampai tanda batas (Depkes RI, 1995).

2. Pembuatan Larutan Asam Asetat 5%

Asam asetat 5% diukur sebanyak 5 ml dan masukan kedalam *beaker glass* kemudian larutkan dengan aquadest hingga larut. Selanjutnya dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml lalu ditambahkan aquadest sampai tanda batas (Depkes RI, 1995).

3.6.6 Penetapan Larutan Baku Kuersetin

1. Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

Preparasi larutan baku kuersetin 100 ppm. Ditimbang sebanyak 10,0 mg dan dilarutkan menggunakan etanol 70% ad 100 ml, sehingga dapat diperoleh konsentrasi 100 ppm (Asmorowati dan Lindawati, 2019).

2. Pembuatan Larutan Seri Baku Kuersetin

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

3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Tambahkan 1 ml larutan kuersetin 100 ppm masukkan kedalam labu ukur 10 ml, kemudian direaksikan dengan 1 ml AlCl₃ 10% dan tambahkan 8 ml asam asetat 5% kedalam larutan. Lalu larutan diukur panjang gelombang maksimumnya dengan menggunakan Spektrofotometri *UV-Visibel* (Syamsul *et al*, 2019).

4. Penetapan *Operating Time* Kuersetin

Masukkan sebanyak 1 ml larutam kuersetin 100 ppm masukkan kedalam labu ukur 10 ml, kemudian direaksikan dengan 1 mL AlCl₃ 10% lalu tambahkan 8 mL asam asetat 5% kedalam larutan. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang maksimal 415 nm dengan interval waktu 2 menit selama 60 menit dan diamati nilai absorbansinya hingga stabil (Sari dan Hastuti, 2020).

5. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan seri dibuat dengan kadar sebesar 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm, dan masing-masing larutan seri ini dipipet 1 mL lalu direaksikan dengan 1 ml AlCl₃ 10% dan tambahkan 8 mL asam asetat 5% kedalam labu ukur 10 ml. Selanjutnya larutan didiamkan selama *operating time* lalu diukur absorbansinya menggunakan alat spektrofotometri *UV-Visibel* dengan panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan (Asmorowati dan Lindawati, 2019).

3.6.7 Penetapan Kadar Flavonoid Total

Larutan sampel 1000 ppm masing-masing dipipet 1 mL lalu tambahkan 1 mL AlCl₃ 10% dan 8 ml asam asetat 5% kedalam labu ukur 10 ml. Sampel diamkan selama *operating time* dan dianalisis menggunakan alat spektrofotometri *UV-Visibel* dengan panjang gelombang maksimum yang sudah ditentukan (Syamsul *et al*, 2019).

Hasil serapan yang menggunakan spektrofotometri *UV-Visibel* dihitung dengan rumus kadar flavonoid total:

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

Keterangan :

C = Kesetaraan kuersetin (mg/L)

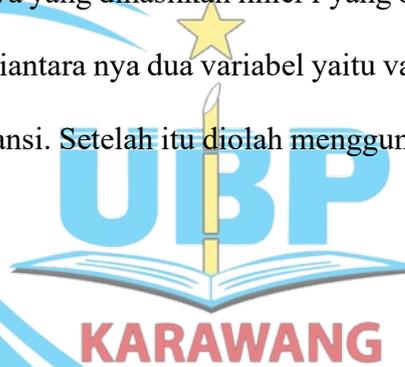
V = Volume total ekstrak (mL)

Fp = Faktor Pengenceran

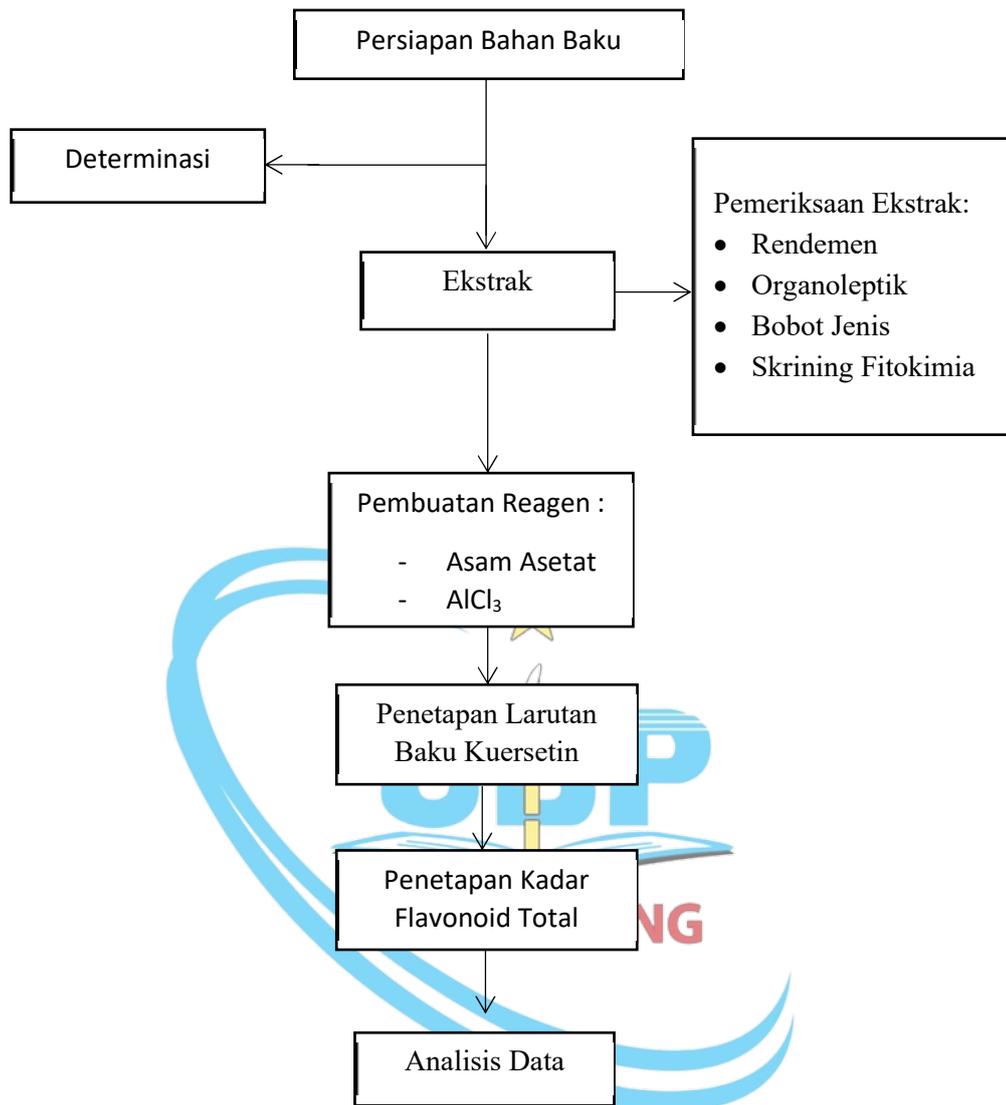
m = Berat sample (mg) (Syamsul et al, 2019)

3.7 Analisis Data

Analisis data yang digunakan yaitu menggunakan analisis data presentif dan analisis data statistika menggunakan uji statistik dengan metode *Independent Sampel T-test*. Dari data kurva kalibrasi ini dapat diperoleh dengan nilai a, b dan r menggunakan regresi linier. Nilai r harus mendekati ± 1 agar kurva yang dihasilkan linier r yang baik yaitu sebesar 0,999 yang artinya korelasi tersebut kuat diantara nya dua variabel yaitu variabel X sebagai konsentrasi dan variabel Y sebagai absorbansi. Setelah itu diolah menggunakan rumus : $Y = bx+a$ (Sari dan hastuti, 2020).



3.8 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.8 Diagram Alir Penelitian.

