

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan dilakukannya Skrining Fitokimia, Uji Kadar Fenolik Total, dan Kadar Flavonoid Total, serta dengan dilakukannya pengujian menggunakan metode analisis FTIR (*Fourier Transform InfraRed*) untuk mengetahui gugus fungsi apa saja yang ada di dalam ekstrak etanol daun terubuk. Rancangan penelitian ini adalah penelitian tunggal, di mana satu kelompok sampel ekstrak etanol daun terubuk akan diuji untuk mengidentifikasi dan mengukur kadar fenolik, flavonoid total, dan melihat gugus fungsi apa saja yang terdapat pada ekstrak daun terubuk dengan menggunakan metode FTIR (*Fourier Transform InfraRed*).

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini sudah dilakukan selama 5 bulan dari bulan Maret hingga Juli 2024.

#### **3.3 Populasi dan Sampel**

Populasi tumbuhan daun terubuk berasal dari Loji, Kabupaten Karawang, Provinsi Jawa Barat sekitar pegunungan Puncak Pegunungan Loji, Kecamatan Tegal Waru, Kabupaten Karawang. Pada penelitian ini digunakan daun terubuk (*Saccharum spontaneum var. edulis (Hassk) K. Schum*) sebagai sampel.

#### **3.4 Alat dan Bahan yang digunakan**

##### **3.4.1 Alat**

Peralatan yang digunakan yaitu pisau, kain hitam, cawan porselin (Pyrex), oven (Mammert), timbangan analitik (Shimadzu), cawan krus, tanur (Nobetherm), desikator (Duran), batang pengaduk (Pyrex), spatula, tabung reaksi, toples bening, rak tabung reaksi, *rotary evaporator* (EYELA), pipet tetes, pipet mikro, gelas ukur (Iwaki), erlenmeyer (Pyrex), *waterbath* (Mammert), spektrofotometri uv-vis (Thermo), kuvet, instrument

FTIR (Shimadzu), beaker glass (Pyrex), labu ukur (Pyrex), wadah, botol vial, pipet tetes, *blue tip*

### 3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Daun Terubuk segar, Asam Klorida Encer (Merck), Air Kloroform (Merck), Etanol 96% (Brataco), Larutan Ammonia ph 8-9 (Merck), Kertas Saring, Kertas Saring Bebas Abu, HCl, Pereaksi Mayer, Wagner, Dragendroff, Serbuk Magnesium, FeCl<sub>3</sub>, NaOH, Vanillin 10%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck), AlCl<sub>3</sub> 7 % (Merck), Aquadest (Brataco), Asam galat, Metanol p.a (Merck), serbuk Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Reagen *Folin-ciocalteu*, KBr.

## 3.5 Variabel Penelitian

### 3.5.1 Klasifikasi Variabel

#### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun terubuk (*Saccharum spontaneum var. edulis* (Hassk) K. Schum).

#### 2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah Standarisasi mutu simplisia, skrining fitokimia, uji total fenolik, uji total flavonoid, dan analisis FTIR (*Fourier Transform InfraRed*) atau Spektroskopi Inframerah.

### 3.5.2 Definisi Operasional Variabel

Definisi Operasional Variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut

**Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel**

Variabel Variabel Bebas	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Ekstrak Etanol Daun Terubuk	Ekstrak etanol adalah ekstrak kental yang terbuat dari daun terubuk yang sudah dikeringkan	Observasi	Rasio	%

kemudian  
diekstraksi  
dengan etanol  
96% untuk  
memperoleh  
rendemen

### Variabel

#### Terikat

Organoleptik	Uji organoleptik adalah pegujian yang dilakukan dengan menggunakan panca indera	Panca indera	Nominal	1. Warna 2. Aroma 3. Bentuk
Kadar Air	Parameter kadar air merupakan parameter untuk mengukur kadar air didalam sampel	Metode gravimetri	Rasio	%
Kadar Sari Larut Etanol	Analisis kandungan kadar sari larut etanol untuk mengetahui jumlah zat yang larut dalam etanol	Metode gravimetri	Rasio	%
Kadar Sari Larut Air	Analisis kandungan kadar sari larut air untuk mengetahui	Metode gravimetri	Rasio	%

	jumlah zat yang larut dalam air			
Kadar Abu Total	Penentuan kadar abu ini melibatkan pengukuran jumlah abu yang berasal dari pengotor yang ada di pasir atau tanah	Metode gravimetri	Rasio	%
Kadar Abu Tidak Larut Asam	Pengukuran kadar abu tidak larut asam adalah bagian abu yang tidak larut dalam asam sehingga menunjukkan jumlah abu yang berasal dari pengotor dalam pasir atau tanah	Metode gravimetri	Rasio	%
Kandungan Metabolit Sekunder	Skrining fitokimia memerlukan pengujian pada tanaman untuk memastikan keberadaan dan jumlah	Uji kualitatif dengan memasukkan bahan kimia ke setiap sampel yang akan	Nominal	1. Warna 2. Buih 3. Endapan

	metabolit sekunder.	diteliti kemudian amati perubahan warna, endapan, dan buih.		
Uji Total Fenolik	Untuk mengetahui jumlah fenol yang terkandung dalam sampel	Menggunakan metode <i>FollinCiocalteu</i> dan Spektrofotometri uvvis	Rasio	Absorbansi
Uji Total Flavonoid	Untuk mengetahui jumlah flavonoid yang terkandung dalam sampel	Analisis kuantitatif menggunakan metode Spektrofotometri uvvis	Rasio	Absorbansi
Analisis FTIR Ekstrak Etanol 96% Daun Terubuk	Untuk mengetahui gugus fungsi pada sampel	Menggunakan instrument FTIR	Rasio	Spektra

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan di Laboratorium Laboratorium Biosistemika dan Molekuler, Departemen Biologi (FMIPA) Universitas Padjajaran, Sumedang, Jawa Barat. Untuk proses awal penelitian ini yaitu dilakukannya identifikasi dan determinasi tumbuhan terubuk dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis yang terdapat dalam literatur, dengan cara memproses sampel tanaman secara utuh dari batang, akar, hingga daun.

#### 3.6.2 Penyiapan Simplisia

Tumbuhan terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk) K. Schum) diperoleh dari wilayah Puncak Loji di Kota Karawang. Proses pengambilan sampel dilakukan dengan memilih daun terubuk, mengumpulkannya, dan meletakkannya dalam wadah yang sesuai. Daun-daun tersebut kemudian dicuci di bawah air mengalir untuk menghilangkan tanah dan kotoran yang menempel. Setelah itu, daun dipotong menjadi ukuran yang lebih pendek dan dijemur di bawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam. Daun yang telah kering dipisahkan dari benda asing, kemudian dihancurkan menggunakan blender dan disaring melalui mesh 40. Sebelum proses maserasi dimulai, serbuk simplisia yang telah dihasilkan diuji terlebih dahulu untuk memastikan parameter standarisasi simplisia (Aulia *et al.*, 2023).

#### 3.6.3 Parameter Standarisasi Simplisia

##### 1. Parameter Spesifik a. Kadar Sari Larut Air

Sebanyak 5 gram simplisia dimaserasi dalam labu Erlenmeyer selama 24 jam dengan menggunakan 100 ml campuran air-kloroform (2,5 ml kloroform dalam 1000 ml air). Campuran ini diaduk secara berkala setiap 6 jam, kemudian dibiarkan selama 18 jam sebelum disaring. Sebanyak 20 ml filtrat dimasukkan ke dalam cawan penguap yang sudah ditera dan diuapkan di atas penangas air hingga kering. Setelah kering, zat tersebut dipanaskan pada suhu 105°C hingga diperoleh berat konstan. Persentase senyawa yang larut dalam air dihitung menggunakan rumus. (Aulia *et al.*, 2023).

### **b. Kadar Sari Larut Etanol**

Sebanyak 5 gram simplisia dimaserasi dengan 100 ml etanol 96% di dalam labu Erlenmeyer. Campuran ini diaduk secara berkala setiap 6 jam, lalu dibiarkan selama 18 jam. Sampel kemudian disaring dengan cepat untuk mencegah penguapan etanol. Sebanyak 20 ml filtrat dimasukkan ke dalam cawan penguap yang telah ditera sebelumnya, lalu diuapkan di atas penangas air hingga kering. Setelah kering, zat yang tersisa dipanaskan pada suhu 105°C hingga beratnya stabil. (Aulia *et al.*, 2023).

### **2. Parameter Non Spesifik a. Kadar Air**

Pengujian kadar air dilakukan dengan mengeringkan cawan porselen di oven pada suhu 105°C selama 1 jam. Setelah itu, cawan didinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang. Sebanyak 2 gram sampel ditimbang menggunakan cawan porselen yang telah diketahui beratnya sebelumnya. Sampel kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam, lalu didinginkan kembali di dalam desikator. Penimbangan dilakukan hingga diperoleh berat yang stabil. (Ida *et al.*, 2023).

### **b. Kadar Abu**

Penentuan kadar abu dilakukan menggunakan metode gravimetri, dimulai dengan memanaskan cawan krus di dalam tanur pada suhu 525°C selama 20 menit. Setelah itu, cawan krus didinginkan dalam desikator selama 30 menit dan kemudian ditimbang dengan neraca analitik untuk mengetahui berat kosongnya. Setelah penimbangan, sebanyak 3 gram simplisia dimasukkan ke dalam cawan krus dan ditimbang kembali. Cawan yang berisi simplisia dipanaskan dalam tanur pada suhu 525°C selama 5 jam hingga terbentuk abu berwarna putih. Setelah itu, cawan krus yang mengandung abu didinginkan kembali dalam desikator selama 30 menit sebelum ditimbang untuk mendapatkan berat akhirnya. (Fikriyah *et al.*, 2021).

### **c. Kadar abu Tidak Larut Asam**

Ketika kadar abu total ditetapkan, abu ditambahkan dengan 10% HCl hingga mencapai volume 25 mililiter, kemudian campuran ditutup dan dipanaskan selama lima menit. Bahan tidak larut asam dikumpulkan

menggunakan kertas saring bebas abu dan dibilas dengan air panas. Kemudian, kertas saring ini dimasukkan ke dalam krus silikat dan dimasukkan ke dalam tanur hingga bobotnya tetap. Rumus ini dapat digunakan untuk menghitung kadar abu tidak larut asam.

(Suryandini, 2019).

#### **3.6.4 Proses Ekstraksi Daun Terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk) K. Schum)**

Setelah dihaluskan dan disaring, simplisia daun terubuk (*Saccharum spontaneum* var. *edulis* (Hassk) K. Schum) sebanyak 500 gram ditimbang, kemudian dimaserasi dengan merendam serbuk menggunakan etanol 96% sebanyak 5000 mL sampai serbuk terendam. Selama lima menit, rendaman didiamkan selama satu hari di ruangan gelap, dan filtrat pertama kemudian disaring dan dimasukkan ke dalam botol gelap. Sisa simplisia dicampur dengan etanol 96% dalam jumlah 5000 mL, sampai sisa simplisia terendam dan diaduk kembali selama lima menit dan didiamkan selama satu hari di ruangan gelap. Kemudian, filtrat kedua disaring dan dituangkan ke dalam botol gelap. Sisa simplisia kemudian ditambahkan dengan etanol 96% dalam jumlah 5000 mL, sampai sisa simplisia terendam dan diaduk kembali selama lima menit dan didiamkan selama satu hari di ruangan gelap. Kemudian, filtrat ketiga disaring. Setelah campuran filtrat diuapkan menggunakan rotary evaporator, air mandi digunakan untuk mengentalkannya sampai terbentuk ekstrak kental. Kemudian, campuran dimasukkan ke dalam wadah steril. (Abiyoga *et al.*, 2021).

#### **3.6.5 Skrining Fitokimia**

##### **1. Alkaloid**

Sebanyak 40 mg ekstrak dilarutkan kemudian saring, lalu tambahkan beberapa tetes HCl 1% dan 1 ml pereaksi mayer. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan atau perubahan larutan menjadi keruh (Cahyaningsih *et al.*, 2019).



## 2. Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak kental dilarutkan dengan lima mililiter aquadest dan dipanaskan selama lima menit. Setelah disaring, 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mililiter HCl pekat ditambahkan ke dalam filtratnya, dan semuanya dikocok. Munculnya warna merah, kuning, atau jingga menunjukkan hasil yang baik (Dewi *et al.*, 2021).

## 3. Tanin

Ekstrak kental sebanyak 0,5 gr ditambahkan dengan 1 ml  $\text{FeCl}_3$  10%. Hasil positif tannin ditunjukkan dengan adanya biru tua, biru kehitaman, atau hitam kehijauan (Dewi *et al.*, 2023).

## 3. Fenolik

Sebanyak 1 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}$  1%. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya warna, merah, biru, ungu, hitam, atau hijau (Aulia *et al.*, 2023).

## 4. Kuinon

Larutkan ekstrak kemudian masukan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan NaOH 1N. kuinon dapat dikatakan positif jika adanya warna kuning (Kusumo *et al.*, 2022).

## 5. Saponin

Sebanyak 0,5 gr ekstrak kemudian tambahkan aquadest sebanyak 10 ml dan dikocok kuat selama 10 detik. Hasil positif saponin dibuktikan dengan adanya buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit dan buih setinggi 1 cm hingga 10 cm, dan jika ditambahkan HCl 2N buih tidak hilang (Dewi *et al.*, 2021).

## 6. Monoterpenoid dan Sesquiterpenoid

Sampel dilarutkan dengan eter digerus, disaring, lalu diuapkan sampai kering, lalu teteskan vanilin 10% dalam  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Hasil positif menunjukkan adanya terbentuknya warna-warna (Aulia *et al.*, 2023).

## 7. Triterpenoid dan Steroid

Ekstrak ditambahkan eter, kemudian diuap kan dalam cawan penguap tambahkan asam asetat anhidrat dan (pereaksi Lieberman Burchard). Jika

terjadi warna ungu membuktikan adanya kandungan triterpenoid dan jika terjadi warna hijau sampai biru membuktikan adanya warna steroid (Vania *et al.*,2019).

### 3.6.6 Penetapan Kadar Fenolik Total

#### a. Penentuan *Operating Time*

Sebanyak 1 mL larutan standar asam galat 50 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,4 mL reagen FolinCiocalteu dan 4 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7%. Absorbansinya diukur dan diamati setiap menit selama 20 menit pada rentang panjang gelombang 400-800 nm (Meilinda *et al.*,2022).

#### b. Penentuan Panjang Gelombang

Sebanyak 1 mL larutan standar asam galat 50 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 0,4 mL reagen *Folin-Ciocalteu* dan 4 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7%. Absorbansinya kemudian diukur pada panjang gelombang 400-800 nm (Meilinda *et al.*,2022).

#### c. Penentuan Kurva Baku Asam Galat

Larutan standar dengan konsentrasi 50 ppm, 40 ppm, 30 ppm, 20 ppm, dan 10 ppm masing-masing diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan 0,4 mL reagen *Folin-Ciocalteu* dan 4 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7%. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang yang telah ditentukan dari pengukuran panjang gelombang maksimum (Meilinda *et al.*,2022).

#### d. Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Daun Terubuk

Larutan ekstrak etanol daun terubuk yang telah dibuat, dipipet sebanyak 1 ml, kemudian tambahkan 0,4 ml reagen *Follin-Ciocalteau*. Sampel dikocok dan dibiarkan selama 4-8 menit. Setelah itu, tambahkan 4,0 ml larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% dan kocok hingga tercampur sempurna. Aquadestilata ditambahkan hingga mencapai volume 10 ml, lalu campuran tersebut didiamkan selama 2 jam pada suhu ruang. Serapan diuku pada panjang gelombang maksimum 744,8 nm. Pengukuran diulang sebanyak 3 kali untuk menentukan kadar fenol yang dinyatakan

sebagai mg ekuivalen asam galat per gram ekstrak (Wahdaningsih *et al.*, 2017).

### 3.6.7 Penetapan Kadar Flavonoid Total

#### a. Penentuan *Operating Time*

Ambil 1 mL larutan baku kerja 80 ppm menggunakan pipet, lalu tambahkan 3 mL metanol p.a, 0,2 mL larutan  $\text{AlCl}_3$  (Aluminium Klorida), dan 0,2 mL larutan  $\text{CH}_3\text{COOK}$  1M (Kalium Asetat). Larutan tersebut kemudian diencerkan dengan akuades hingga mencapai volume 10 mL. Absorbansi diukur setiap 5 menit mulai dari menit ke-0 hingga ke-60 pada panjang gelombang maksimum 430 nm, hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Safil *et al.*, 2023).

#### b. Penentuan Panjang Gelombang

Sebanyak 1 mL larutan standar kuersetin 40 ppm dipipet, kemudian ditambahkan 3 mL metanol, 0,2 mL Al 10%, dan 0,2 mL kalium asetat 1 M. Larutan ini kemudian diencerkan dengan akuades hingga mencapai volume 10 mL, dibiarkan pada suhu 25-30°C selama 30 menit. Spektrum serapan larutan tersebut diamati menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Sebagai blanko, digunakan campuran yang terdiri dari 3 mL metanol, 0,2 mL Al 10%, 0,2 mL kalium asetat 1 M, dan akuades hingga mencapai volume 10 mL (Juliadi *et al.*, 2024).

#### c. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, dan 80 ppm masing-masing dipipet sebanyak 1 mL, lalu ditambahkan 3 mL metanol, 0,2 mL Al 10%, serta 0,2 mL kalium asetat 1 M, dan kemudian diencerkan dengan akuades hingga mencapai volume 10 mL. Setelah itu, larutan didiamkan pada suhu ruang 20-30°C selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Sebagai blanko, digunakan campuran yang terdiri dari 3 mL metanol, 0,2 mL Al 10%, 0,2 mL kalium asetat 1 M, dan akuades hingga mencapai volume 10 mL (Juliadi *et al.*, 2024).

**d. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Terubuk**

Sebanyak 25 mg ekstrak etanol daun terubuk ditimbang dan diarutkan dalam 25ml metanol PA. Prosedur ini dilakukan dalam tiga kali repikasi, di mana masing masing 0,5 ml larutan dipipet kemudian ditambahkan 3 ml metanol, 0,2 ml  $AlCl_3$  10%, 0,2 ml kalium asetat 1M, dan ditambahkan aquadest hingga mencapai volume 10 ml. setelah itu, campuran didiamkan pada suhu ruang 25-30° C selama 30 ment, kemudian absorbansinya diukur menggunakan Spektrofotometri UVVis pada panjang gelombang maksimum (Juliadi *et al.*,2024).

**3.6.8 Analisis Gugus Fungsi Ekstrak Etanol 96% Daun Terubuk**

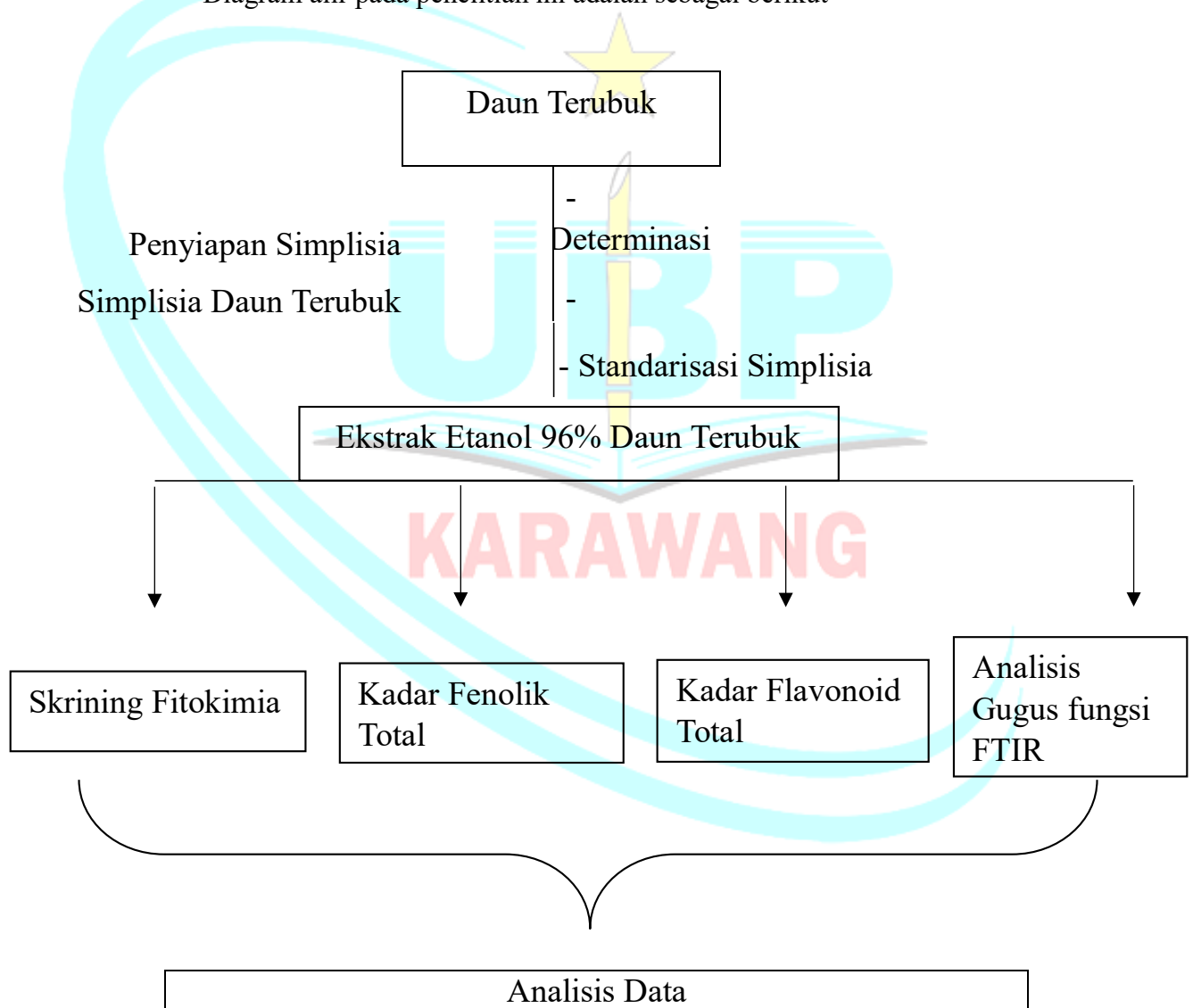
Metode pelet KBr juga digunakan untuk memeriksa fungsi ekstrak etanol daun terubuk dengan Fourier Transform Infrared (FTIR). Sampel sebanyak 2 mg dicampur dengan 100 mg serbuk KBr kering hingga homogen. Selanjutnya, campuran sampel dan KBr dipadatkan dalam cetakan menggunakan pompa hidrolik hingga membentuk pelet atau kepingan tipis. Spektrofotometer FTIR *Fourier Transform Infrared* digunakan untuk mengkarakterisasi kepingan pelet tersebut dengan panjang gelombang daerah inframerah sedang (4000–450  $cm^{-1}$ ). Grafik menunjukkan hasilnya. Selanjutnya, spektrum yang ditunjukkan dalam grafik ini dianalisis dengan membandingkannya dengan literatur untuk mengidentifikasi gugus fungsi ekstrak. (Marselia *et al.*, 2021).

**3.7 Analisis Data**

Data hasil pengujian parameter standarisasi simpisia, dan skrining fitokimia yang diperoleh, di analisis dan dimuat dalam bentuk tabel. Hasil penetapan kadar fenolik total dan flavonoid total dihitug dengan memasukan kedalam persamaan regresi linier  $y = a x + b$ , kemudian data diolah menggunakan Microsoft Excel dan dibuat grafik yang menggambarkan hubungan antara nilai absorbansi dengan konsentrasi larutan sehingga diperoleh persamaan regresi linier. Serta hasil pengujian FTIR dinyatakan dalam bentuk spektra.

### 3.8 Diagram Alir

Diagram alir pada penelitian ini adalah sebagai berikut



**Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian**