

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Juni 2025 di Laboratorium Kimia Program Studi Farmasi Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu spektrofotometer, oven (Getra), *waterbath* (Biobase), tanur, homogenizer, moisture analyzer, timbangan analitik, blender (Philips), toples kaca, kompor listrik, beaker glass (*pyrex*), erlenmeyer (*pyrex*), labu ukur (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), tabung reaksi (*pyrex*), rak tabung, corong kaca, batang pengaduk, pipet tetes, cawan porselen, krus silika.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.), daun sirsak (*Annona muricata* L.), daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), daun kemangi (*Ocimum basilicum*), daun pepaya (*Carica papaya* L.), etanol 96%, kuersetin, MgSO_4 , HCl pekat, HCl 2N, reagen *dragendorf*, reagen *mayer*, reagen *wagner*, kloroform, asam asetat anhidrat, H_2SO_4 pekat, FeCl_3 1%, kertas saring bebas abu, serbuk AlCl_3 , serbuk CH_3COOK , aquadest.

3.3 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental di Laboratorium Kimia Program Studi Farmasi Universitas Bhamada Slawi.

a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun kelor, daun sirsak, daun pandan wangi, daun kemangi, dan daun pepaya.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah analisis kandungan flavonoid dan spektrofotometri uv-vis.

c. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah pengambilan simplisia dan metode maserasi.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi

Tanaman yang akan diteliti perlu dilakukan determinasi sebelum diambil sebagai sampel. Determinasi dilakukan untuk memastikan keaslian tanaman yang akan diteliti dan mencegah terjadinya kesalahan dalam pengumpulan materi serta menghindari kemungkinan pencampuran tanaman yang akan diteliti dengan jenis lain (Klau & Hesturini, 2021). Determinasi dilakukan di Laboratorium Farmasi Bahan Alam Program Studi S-1 Farmasi Universitas Bhamada Slawi.

3.4.2 Penyiapan Simplisia

Sampel yang digunakan berupa daun kelor, daun sirsak, daun pepaya, daun pandan, dan daun kemangi. Setelah dikumpulkan, masing-masing sampel dilakukan penyortiran basah, pencucian dengan air mengalir, penirisan, pengeringan dengan menggunakan *oven drying* pada suhu kurang dari 60°C. Setelah kering, dilakukan penyortiran

kering dan diblender menjadi serbuk. Selanjutnya dilakukan ekstraksi (Panaungi & Sakka, 2022).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak

Masing-masing serbuk simplisia ditimbang sebanyak 250 gram dimasukkan ke dalam wadah toples kaca, kemudian direndam menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1:4 (simplisia : pelarut). Toples kaca ditutup rapat dan disimpan pada tempat yang terlindungi dari cahaya matahari langsung selama 3 hari sambil dilakukan pengadukan beberapa kali. Hasil maserasi kemudian disaring untuk memisahkan cairan etanol dengan ampasnya. Kemudian diuapkan dengan *waterbath* untuk memperoleh ekstrak kental (Pratiwi et al., 2023). Ekstrak yang diperoleh kemudian ditimbang dan dihitung besar rendemen, dengan rumus (Syamsul et al., 2020):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{bobot simplisia awal}} \times 100\%$$

3.4.4 Parameter Ekstrak

a. Parameter Spesifik

Parameter spesifik yang dilakukan yaitu uji organoleptik. Uji ini ditujukan untuk mengevaluasi bentuk, warna, aroma, dan rasa dengan melibatkan penilaian sensoris melalui pancaindera (Dayanti et al., 2022).

b. Parameter Non Spesifik

1) Kadar Air

Kadar air diukur menggunakan alat *moisture analyzer*, yaitu dengan menimbang ekstrak sebanyak 1 gram ke dalam alat tersebut, kemudian ditunggu hingga hasil kadar air dari sampel muncul (Astuti et al., 2024). Syarat kadar air ekstrak yaitu tidak melebihi 10% (Utami et al., 2017).

2) Kadar Abu

Timbang 1 gram ekstrak dan masukkan ke dalam krus silika yang sudah dipanaskan dan ditara sebelumnya. Kemudian, tempatkan ke dalam tungku, panaskan secara perlahan dengan suhu dinaikkan secara bertahap hingga mencapai 600°C, sampai semua arang terbakar habis, dinginkan dalam desikator, lalu timbang (Maryam et al., 2020). Ekstrak tersebut dapat memenuhi syarat jika hasilnya kurang dari 10% (Dewi et al., 2023). Kadar abu dapat dihitung menggunakan rumus (Smith et al., 2023):

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{Berat abu(g)}}{\text{Berat sampel awal (g)}} \times 100\%$$

3.4.5 Uji Skrining Fitokimia

a. Uji Flavonoid

Masing-masing ekstrak sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan 2,5 mL aquadest kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 0,2 mg serbuk magnesium sulfat dan 3 tetes HCl pekat. Panaskan selama 15 menit di atas penangas air, kocok dan amati

perubahan warna. Jika larutan menunjukkan warna merah, kuning, atau jingga, maka menandakan keberadaan senyawa flavonoid (Pratiwi et al., 2023).

b. Uji Alkaloid

Masing-masing ekstrak ditimbang sebanyak 1 gram, ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL aquadest, selanjutnya dipanaskan diatas penangas air selama dua menit, setelah itu didinginkan dan disaring. Filtrat yang dihasilkan digunakan untuk pengujian alkaloid, diambil 3 tabung reaksi, kemudian masing-masing tabung diisi dengan 1 mL filtrat. Tabung pertama ditambahkan 5 tetes reagen *Mayer*, tabung kedua ditambahkan 5 tetes reagen *Dreagendorf*, dan tabung ketiga ditambahkan reagen *Wagner*. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada tabung pertama, endapan berwarna jingga pada tabung kedua, dan endapan berwarna coklat pada tabung ketiga (Nurjannah et al., 2022).

c. Uji Saponin

Sebanyak 1 gram dari masing-masing ekstrak, dilarutkan dengan 10 mL aquadest, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Dikocok kuat selama 10 detik. Apabila terdapat busa dengan ketinggian 1-10 cm, dan dapat bertahan selama 10 menit, tambahkan 1 tetes HCl 2N. Jika busa tersebut tidak hilang, maka ekstrak tersebut mengandung saponin (Baharuddin, 2017).

d. Uji Steroid

Sebanyak 0,5 gram dari masing-masing ekstrak dilarutkan dengan aquadest 2,5 mL dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform dan ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Kemudian ditambahkan 1-2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung reaksi. Apabila terbentuk warna hijau kebiruan, menandakan ekstrak mengandung steroid (Pratiwi et al., 2023).

e. Uji Tanin

Masing-masing ekstrak sebanyak 1 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1%. Apabila larutan berubah warna menjadi hijau kehitaman atau biru tua maka ekstrak tersebut mengandung tanin (Utami & Jariah, 2023).

3.4.6 Analisis Kandungan Flavonoid Total dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS

a. Pembuatan Larutan Aluminium Klorida (AlCl_3) 2%

Sebanyak 2 gram serbuk AlCl_3 ditimbang dan dilarutkan dalam sebagian aquadest dengan menggunakan beaker glass, kemudian encerkan dengan aquadest hingga volume 100 mL (Disi et al., 2024).

b. Pembuatan Larutan Kalium Asetat (CH_3COOK) 120 mM

Serbuk CH_3COOK ditimbang sebanyak 0,30 gram dan dilarutkan dengan aquadest dalam labu ukur 25 mL sampai garis batas lalu dihomogenkan (Iskandar et al., 2019).

c. Penyiapan Larutan Induk Kuersetin 1000 ppm

Sebanyak 10 mg kuersetin ditimbang dan dilarutkan menggunakan etanol 96% sampai 10 mL dalam labu ukur (Cahyanta, 2016).

d. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin 100 ppm

Pembuatan larutan standar kuersetin 100 ppm dilakukan dengan seri pengenceran dari konsentrasi 1000 ppm, larutan induk dipipet sebanyak 10 mL dan ditambahkan etanol 96% sampai 100 mL dalam labu ukur, sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm (Elvira et al., 2024).

e. Pembuatan Larutan Blanko

Diambil AlCl_3 2% sebanyak 1 mL dan CH_3COOK 120 mM sebanyak 1 mL, kemudian tambahkan etanol 96% sampai 10 mL. Larutan blanko dibuat sebagai larutan pembanding dengan sampel (Elvira et al., 2024).

f. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Larutan standar kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 4 mL, ditambahkan dengan etanol 96% hingga 10 mL dalam labu ukur, sehingga diperoleh konsentrasi 40 ppm. Larutan tersebut dipipet sebanyak 1 mL ditambahkan AlCl_3 2% 1 mL dan CH_3COOK 120 mM sebanyak 1 mL. Selanjutnya, diukur serapan pada panjang gelombang 300-600 nm. Hasil dari panjang gelombang maksimum, digunakan untuk mengukur absorbansi dari sampel (Syarifuddin et al., 2022).

g. Penetapan *Operating Time*

Larutan standar kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 4 mL, ditambahkan dengan etanol 96% hingga 10 mL dalam labu ukur, sehingga diperoleh konsentrasi 40 ppm. Larutan tersebut dipipet sebanyak 1 mL ditambahkan AlCl_3 2% 1 mL dan CH_3COOK 120 mM sebanyak 1 mL. Absorbansi dari campuran ini diukur pada panjang gelombang maksimum teoritis antara 300-600 nm. Pengukuran dilakukan dengan interval waktu 2 menit hingga nilai absorbansi menjadi stabil. Selanjutnya, dibuat kurva yang menunjukkan hubungan antara absorbansi, waktu, dan ditentukan *operating time* (Syifa et al., 2022).

h. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm dipipet sebanyak 2, 3, 4, 5, dan 6 mL ditambah etanol 96%, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm. Masing-masing konsentrasi dari larutan seri diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan AlCl_3 2% sebanyak 1 mL dan 1 mL CH_3COOK 120 mM, diamkan selama *operating time*. Absorbansi ditentukan pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Elvira et al., 2024).

i. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Masing-masing sampel ditimbang sebanyak 10 mg, dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan tersebut dipipet sebanyak 1 mL, tambahkan etanol 96%

sampai 5 mL, sehingga dihasilkan konsentrasi 200 ppm. Kemudian larutan tersebut dipipet sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan AlCl_3 2% sebanyak 1 mL dan CH_3COOK 120 mM sebanyak 1 mL. Diamkan sampel selama *operating time*. Kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh, dibuat dalam tiga replikasi dan diperoleh nilai rata-rata absorbansi (Elvira et al., 2024).

3.5 Analisis Data

Konsentrasi flavonoid dinyatakan dalam mg ekuivalen kuersetin per gram ekstrak, yang dihitung dengan rumus berikut (Risma et al., 2023) :

$$\text{Total Flavonoid} = \frac{C \times V \times \text{FP}}{W}$$

Keterangan :

C = Konsentrasi flavonoid (nilai x)

V = Volume larutan sampel (L)

FP = Faktor pengenceran

W = Berat sampel yang digunakan (gram)