BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain yang digunakan pada penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif dengan metode eksperimental. Daun kersen (*Muntingia calabura* L.*)* diekstraksi dengan teknik ultrasonik menggunakan pelarut etanol 96%. Filtrat hasil esktraksi kemudian dipekatkan sehingga didapatkan ekstrak kental untuk mengidentifikasi kadar senyawa total flavonoid dan fenolik. Standar yang digunakan pada penentuan kadar senyawa flavonoid yaitu kuersetin, sedangkan penetapan kadar total senyawa fenolik menggunakan standar asam galat. Pada penentuan kadar senyawa flavonoid dan fenolik dilakukan menggunakan metode spektrofotometri UV-*Visible*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan Juli tahun 2022.

C. Populasi dan Sampel

Pada penelitian ini bahan yang dipakai merupakan daun kersen yang sesuai dengan kriteria antara lain daun berwarna hijau tua (urutan ke 3 hingga 6 dari pucuk tanaman kersen), daun mendatar, tepi daun bergerigi, dan ujung daun runcing (Sulaiman *et al*., 2017). Tanaman kersen yang digunakan didapatkan dari daerah persawahan Desa Ambarketawang, Kecamatan Gamping, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel terikat: kadar total flavonoid dan fenolik.
2. Variabel bebas: kadar senyawa standar flavonoid dan fenolik.
3. Variabel terkendali: metode ekstraksi, penyortiran sampel, waktu pengambilan sampel, temperatur serta pelarut ekstraksi.

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

E. Definisi Operasional

1. Asam galat adalah senyawa pembanding pada penetapan kadar senyawa fenolik, sedangkan kuersetin sebagai pembanding yang dipakai pada uji penetapan kadar senyawa flavonoid.
2. Kadar senyawa fenolik dan flavonoid total pada penelitian merupakan jumlah dari kandungan total senyawa fenolik dan flavonoid yang ada pada ekstrak dengan pengukuran absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (nm).
3. Metode yang dipakai pada penelitian merupakan metode ekstraksi ultrasonik.
4. Etanol 96% adalah pelarut yang digunakan pada penelitian ini.
5. Daun kersen yang berwarna hijau tua (urutan ke 3 hingga 6 dari pucuk) merupakan sampel yang digunakan pada penelitan ini.
6. Waktu panen pada pengambilan daun dilakukan pada pagi hari pukul 06.00-10.00 WIB.
7. Suhu 40°C adalah suhu yang dipakai pada saat proses ekstraksi berlangsung.

F. Alat dan Bahan

1. **Alat:** gelas ukur (Iwaki), *beaker glass* (Iwaki), kaca arloji, labu takar (Iwaki), mikropipet (Socorex), *blender*/alat penyerbuk, pipet ukur, pipet tetes, plat tetes, propipet, sendok kaca, spatula/sendok besi, tabung reaksi (*Pyrex*'Iwaki), spektrofotometer UV-Vis *double beam* (*Thermo Scientific* Genesis 10S), neraca analitik (Ohaus), ayakan nomor 40 mesh, oven (Memmert UN160), erlenmeyer (Iwaki), *ultrasonic cleaner*, *waterbath* (Memmert WNB10FC), bejana pengembang, *chamber* KLT, lampu ultraviolet 254 dan 366 nm, pipa kapiler, batang pengaduk, botol ekstrak (vial), rak tabung reaksi, semprotan KLT.
2. **Bahan:** Reagen aluminium klorida, aluminium foil, standar asam galat & kuersetin, HCl pekat, aquadest, CH_3COOH, CH_2O_2, C_3H_6O, etanol 96%, $CHCl_3$ (kloroform), *ethyl acetate*, besi (III) klorida, kain, metanol *p.a*, Na_2CO_3 7%, silika gel GF_{254}, pereaksi Dragendroff, Mayer, Wagner, reagen Folin-Ciocalteu, simplisia daun kersen, *water for injection* (WFI), aquabidest, kloroform, n-heksan.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan Bahan dan Determinasi Tanaman

Daun kersen (*muntingia calabura* L.) didapatkan dari daerah persawahan Desa Ambarketawang Kecamatan Gamping, Kabupaten Sleman, Yogyakarta. Daun yang dipilih masih berwarna hijau tua (urutan ke-3 hingga 6 dari pucuk) tanaman kersen. Pemilihan daun hijau dikarenakan kadar flavonoid pada daun tua lebih tinggi dibandingkan daun muda (Nurholis *et al.,*2019). Pengambilan daun dilakukan pada pagi hari pada pukul 06.00 – 10.00 WIB, karena pada waktu tersebut daun sedang membuka secara sempurna, belum mengalami penguapan yang diakibatkan oleh polusi udara serta reaksi fotosintesis pada tanaman belum terjadi (Sulaiman *et al*., 2017). Setelah itu tanaman kersen (*Muntingia calabura* L.) di determinasi di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta. Determinasi bertujuan untuk mendapatkan identitas dari tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian (Diniatik, 2015).

2. Penyiapan Sampel

Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang telah diperoleh, dilakukan sortasi basah serta dipisahkan dari kotoran, kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan dipotong kecil-kecil untuk memudahkan proses pengeringan daun menjadi simplisia. Tahap pencucian bahan dilakukan untuk melepaskan sampel dari partikel asing yang berada pada daun. Sampel daun kersen dijadikan simplisia menggunakan oven pada temperatur 40°C selama 48 jam dengan tujuan mengurangi kadar air pada bahan yang dapat menghambat tahap penarikan zat aktif, banyaknya kadar air yang terkandung pada sampel menyebabkan rusaknya sampel karena terdapat jamur. Apabila daun rapuh saat digenggam, hal tersebut dapat dikatakan daun sudah kering/kadar air pada daun sudah berkurang. Simplisia daun kersen dihaluskan menggunakan *blender* untuk memperkecil ukuran partikel agar pelarut dapat mudah menyerap dan menghasilkan ekstrak lebih banyak, setelah itu dilakukan pengayakan menggunakan ayakan 40 mesh karena semakin besar nomor

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

ayakan akan memperluas permukaan tanaman dan mendapatkan ukuran serbuk yang seragam. Tujuan dari proses pengayakan adalah untuk memisahkan bagian yang tidak diinginkan berdasarkan ukurannya (Sulaiman *et al*., 2017). Sampel daun kersen yang didapatkan dari proses penyerbukan sebanyak 400 gram

3. Ekstraksi Sampel

Serbuk daun kersen sebanyak 200 gram dilarutkan dengan 2 liter pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 hingga semua bahan tenggelam seluruhnya. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode ultrasonik selama 10 menit pada suhu 40°C dan frekuensi 20 kiloHertz (kHz) agar dapat didengar oleh telinga manusia. Pelarut etanol 96% bersifat tidak toksik, selektif, absorbsinya baik, dan memiliki kemampuan penyarian yang tinggi sehingga dapat menyari senyawa yang bersifat non polar, semi polar, dan polar (Wendersteyt *et al.*, 2021). Filtrat yang diperoleh dari proses ekstraksi dipekatkan menggunakan *waterbath* pada suhu 40°C sehingga didapatkan ekstrak yang kental (Puspitasari *et al.,*2017).

4. Kontrol Kualitas Ekstrak

Ekstrak kental yang telah diperoleh digunakan untuk pengujian selanjutnya yaitu pemeriksaan organoleptik dan penentuan rendemen ekstrak.

a. Perhitungan ekstrak rendemen daun kersen menggunakan persamaan:

$$\%\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} x100\%$$

b. Pemeriksaan organoleptik. Pemeriksaan seperti bentuk, rasa, aroma, dan warna.

5. Penapisan Fitokimia

Pengujian ini dilakukan sebagai uji pendahuluan dalam menentukan golongan senyawa metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas biologi dari suatu tumbuhan.

a. Identifikasi Flavonoid

Ekstrak daun kersen sebanyak 100 mg ditambahkan dengan 2 mL air panas dan magnesium serbuk secukupnya, kemudian diaduk hingga

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

rata. Lalu diberi asam klorida dan etanol 96% sebanyak 4-5 tetes lalu diaduk homogen. Hasil positif jika muncul warna merah, kuning atau jingga pada ekstrak sampel.

b. Identifikasi Fenolik

Ekstrak daun kersen sebanyak 100 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dikocok dengan eter secukupnya. Kemudian lapisan eter dikeringkan pada plat tetes dan diberi $FeCl_3$ sebanyak 2-3 tetes, dikatakan positif mengandung fenolik apabila terdapat warna hijau kehitaman pada ekstrak sampel tersebut.

c. Uji Tanin

Ekstrak daun kersen sebanyak 100 mg ditambahkan dengan 1-2 mL aquadest dan 2 tetes besi (III) klorida 1%. Dikatakan mengandung senyawa tanin apabila ekstrak sampel menghasilkan warna biru kehitaman.

d. Uji Saponin

Ekstrak daun kersen sebanyak 100 mg ditambahkan dengan 0,5 mL aquadest panas lalu diaduk selama 1 menit. Terdapat busa pada larutan, maka ditambahkan asam klorida 1% dan didiamkan selama 10 menit. Dikatakan positif mengandung senyawa saponin jika busa pada larutan tersebut tidak hilang (Sangi *et al*., 2012).

e. Uji Alkaloid

Dilarutkan 100 mg ekstrak dengan HCl 1% sebanyak 2 mL dan pisahkan menjadi 3 bagian dalam tabung reaksi. Tabung reaksi pertama diberi 3 tetes reagen Dragendroff, apabila terdapat endapan berwarna coklat jingga maka hasilnya positif. Pada tabung reaksi kedua ditambahkan 3 tetes reagen Mayer, jika terbentuk endapan berwarna putih atau kuning maka hasilnya adalah positif. Tabung reaksi ketiga diberikan 3 tetes reagen Wagner, apabila terdapat endapan berwarna coklat maka hasilnya dapat dikatakan positif. Dikatakan mengandung alkaloid apabila 2 dari 3 reaksi di atas memberikan reaksi positif (Hadi *et al.,*2019).

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

6. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Senyawa Flavonoid

Pengujian KLT untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid ekstrak etanol 96% daun kersen dilakukan secara kualitatif dengan tujuan mengetahui ada atau tidak senyawa penanda dalam ekstrak etanol daun kersen. Komponen yang digunakan pada metode ini merupakan fase gerak berupa suatu pelarut atau solvent serta *developing chamber* sebagai tempat berlangsungnya elusi, fase diam plat silika GF_{254}.

a. Penjenuhan *Chamber*

Optimasi fase gerak dibuat kombinasi antara kloroform:metanol (7:3), kloroform:metanol (9:1), dan n-heksan:etil asetat (5:5). Optimalisasi fase gerak berfungsi untuk mencari kondisi terbaik dalam hal menganalisis kombinasi pelarut fase gerak. Dari masing-masing fase gerak dimasukkan ke dalam *chamber*. Masukkan kertas saring (20 cm) ke dalam *chamber.* Tutup rapat *chamber* dan tunggu sampai *chamber* jenuh (kertas saring yang terbasahi oleh fase gerak). Penjenuhan dilakukan dengan tujuan menyeimbangkan tekanan uap yang terjadi pada fase gerak sehingga pemisahan komponen senyawa dapat berjalan baik.

b. Prosedur KLT

Fase diam yang digunakan pada pengujian KLT berupa plat silika GF254. Plat KLT yang digunakan sebesar 10x3 cm, di oven selama 15 menit pada suhu 100°C untuk menghilangkan kandungan air pada plat. Diberi penanda atas dan bawah (1 cm) pada plat. Ditotolkan ekstrak etanol daun kersen menggunakan *whitetip* dengan konsentrasi 50.000 ppm (50 mg/1 ml metanol) dan standar kuersetin dengan optimasi konsentrasi yaitu 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm. Dimasukkan plat KLT dalam *chamber* yang sudah jenuh lalu ditunggu sampai eluen naik. Ambil dan keringkan plat. Diamati noda pada sinar UV 254 nm dan 366 nm, setelah itu disemprotkan dengan aluminium klorida 5%, dan dihitung nilai Rf (*Retardation Factor)*

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

$$Rf = \frac{\text{Jarak tempuh analit}}{\text{Jarak tempuh pelarut}}$$

7. Penentuan Kadar Fenolik Total Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*)

Penetapan kadar senyawa fenolik total menggunakan kolorimetri Folin-Ciocalteu pada prosedur Chun *et al*., (2003) dalam Malik *et al*., (2015) serta asam galat sebagai pembanding.

a. Pembuatan larutan pembanding asam galat

Ditimbang 10 mg asam galat lalu dilarutkan dengan metanol *p.a* sampai 10 mL dan diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Dibuat seri konsentrasi dari larutan stok asam galat yaitu 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, kemudian dicukupkan dengan metanol *pa* ad 5 mL dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (nm).

b. Penentuan *operating time* (OT)

Diadakan OT untuk mengetahui *timer* penentuan senyawa yang didapatkan saat absorbansi paling stabil (Arifiyana & Dipahayu, 2018). Diambil 0,1 mL larutan stok standar asam galat lalu ditambahkan Folin-Ciocalteu sebanyak 0,1 mL, larutan Na_2CO_3 7% sebanyak 1 mL dan WFI ad 5 mL. Dibaca serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maks (nm) dan interval waktu 2 menit hingga mencapai nilai absorbansi yang relatif stabil.

c. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ maks)

Penentuan panjang gelombang maksimum ini bertujuan untuk mengetahui pada serapan berapa zat yang dibaca oleh spektrofotometer UV secara optimum (Pertiwi et al., 2020). Diambil 0,1 mL larutan asam galat dengan konsentrasi 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm ditambah 0,1 mL Folin-Ciocalteu dan 1 mL larutan natrium karbonat 7% dan WFI ad 5 mL, kemudian didiamkan selama *operating time*. *Scanning* pada panjang gelombang serapan maksimum yaitu 600 nm - 800 nm.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

d. Pembuatan kurva baku standar asam galat

Diambil 0,1 mL pada tiap konsentrasi 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm kemudian ditambahkan reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 0,1 mL, lalu diaduk dan didiamkan selama 4 menit. Ditambahkan larutan natrium karbonat 7% sebanyak 1 mL dan diaduk ad homogen, kemudian ditambahkan WFI ad 5 mL dan dibiarkan selama *operating time* pada temperatur ruang. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dan replikasi sebanyak 3x.

e. Penetapan kadar total fenolik

Diencerkan ekstrak sampel dengan metanol *pa* pada konsentrasi 8000 ppm (80 mg/ 10 mL metanol) kemudian diambil 0,1 mL larutan ekstrak dan ditambahkan 0,1 mL reagen Folin-Ciocalteu kemudian dibiarkan 4 menit. Ditambahkan 1 mL larutan Na_2CO_3 7% serta WFI ad 5 mL, diaduk homogen. Dibiarkan selama waktu OT pada suhu ruangan dan dilakukan replikasi sebanyak 3x pengukuran absorbansi serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (nm).

8. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*)

Penentuan kadar senyawa flavonoid total ekstrak daun kersen dengan metode kolorimetri $AlCl_3$ yang mengacu pada prosedur Chang *et al.,* dalam Ahmad *et al.,* (2015) dengan standar kuersetin.

a. Pembuatan larutan standar kuersetin

Serbuk kuersetin sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dengan etanol *pa* hingga tanda batas sehingga didapatkan larutan stok 1000 ppm. Larutan stok dibuat antara konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm, 140 ppm dan dicukupkan dengan etanol *pa* ad 10 mL. Diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (nm).

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

b. Penentuan *operating time* (OT)

OT dilakukan untuk mengetahui pengukuran waktu senyawa yang didapatkan saat absorbansi paling stabil (Arifiyana *et al.,*2018). Diambil 1 mL larutan stok kuersetin dan ditambah dengan 1 mL aluminium klorida 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Dilakukan pengukuran absorbansi pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (nm) pada interval waktu 2 menit sehingga didapatkan nilai absorbansi relatif stabil.

c. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ maks)

Penentuan panjang gelombang maksimum ini bertujuan untuk mengetahui pada serapan berapa zat yang dibaca oleh spektrofotometer UV secara optimum (Pertiwi *et al*., 2020). Diambil 1 mL larutan stok kuersetin kemudian ditambah dengan $AlCl_3$ 10% sebanyak 1 mL dan *acetic acid* 5% sebanyak 8 mL. Dibaca pada spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 350-450 nm.

d. Pembuatan kurva baku standar kuersetin

Dibuat seri konsentrasi menggunakan kuersetin sebagai baku standar. Penentuan kurva baku kuersetin dibuat seri konsentrasi sebesar 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm, 140 ppm. Diambil larutan dari masing-masing konsentrasi sebanyak 1 mL kemudian direaksikan dengan 1 mL aluminium klorida 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum. Dari tiap konsentrasi kuersetin dilakukan pengukuran replikasi sebanyak 3x.

e. Penetapan kadar total flavonoid

Dilarutkan ekstrak daun kersen menggunakan etanol *pa* dengan seri konsentrasi 4000 ppm dan 8000 ppm, kemudian diambil 1 mL larutan ekstrak etanol daun kersen dan ditambah $AlCl_3$ 10% sebanyak 1 mL dan 8 mL *acetic acid* 5%. Dilakukan inkubasi selama *operating time*, dan dilakukan 3x replikasi pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (nm).

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari nilai absorbansi pada tiap larutan standar kuersetin dan larutan standar asam galat dengan kurva kalibrasi serta didapatkan persamaan regresi linier. Data yang diperoleh tersebut merupakan data primer. Kadar total senyawa pada analisis data dengan memasukkan data tersebut pada persamaan regresi linier yaitu y = bx + a, dimana data tersebut didapatkan dari tiap kurva kalibrasi larutan standar. Pada persamaan regresi linier, nilai y menyatakan absorbansi dan x merupakan konsentrasi/kadar senyawa. Program *Microsoft Excel* merupakan program yang digunakan untuk menghitung persamaan regresi linier sehingga dihasilkan persamaan linier standar pada kurva absorbansi versus konsentrasi .

Larutan sampel yang dihitung pada persamaan linier dari standar sehingga diperoleh data konsentrasi senyawa fenolik dan flavonoid. Penentuan kadar total senyawa fenolik dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$TPC = \frac{C.V.fp}{g}$$

Keterangan:

TPC = *Total Phenolic Content*

C = Konsentrasi fenolik (nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)

Fp = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g)

Penentuan kadar total senyawa flavonoid dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$TFC = \frac{C.V.fp}{g}$$

Keterangan:

TFC = *Total Flavonoid Content*

C = Konsentrasi flavonoid (nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)

Fp = Faktor pengenceran

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

g = Berat sampel yang digunakan (g)

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

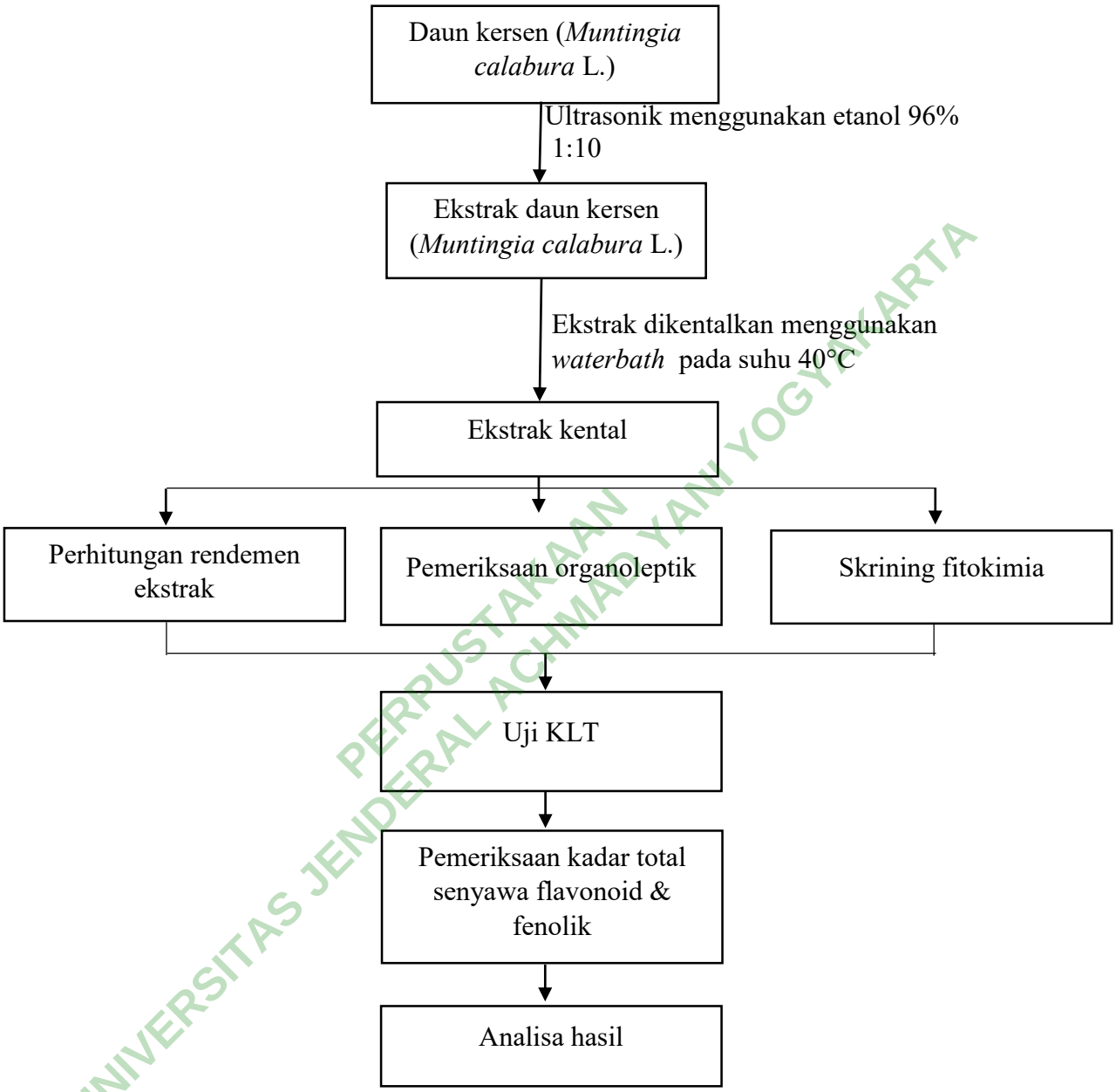
I. Rencana Pelaksanaan Skripsi

Tabel 4. Rencana Pelaksanaan Skripsi

No.	Penelitian	Bulan							
		Januari	Februari	Maret	April	Mei	Juni	Juli	Agsts
1.	Pembuatan proposal								
2.	Ujian proposal								
3.	Pengurusan surat								
4.	Ekstraksi daun kersen								
5.	Skrinning fitokimia								
6.	Perhitungan rendemen ekstrak								
7.	Pemeriksaan organoleptik								
8.	Uji KLT								
9.	Uji total kandungan fenolik dan flavonoid								
10.	Pengolahan data								
11.	Penyusunan laporan hasil								
12.	Ujian hasil penelitian								

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA
PERPUSTAKAAN

Bagan Alur Penelitian



Gambar 6. Bagan Alur Penelitian

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA