

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan metode eksperimental. Metode eksperimental adalah suatu metode untuk mengetahui hubungan sebab-akibat dari suatu variabel dengan variabel lainnya. Dalam penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa flavonoid dalam ekstrak dan fraksi bunga cengkeh, pengaruh sifat pelarut terhadap kadar flavonoid total serta jumlah kadar flavonoid total.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta mulai dari proses dilakukannya pengelolaan sampel uji yaitu bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) hingga diperoleh ekstrak etanol bunga cengkeh, kemudian dilanjutkan proses fraksinasi dengan 3 jenis pelarut yaitu n-heksan yang bersifat non-polar; etil asetat bersifat semipolar dan air yang bersifat polar serta dilakukan uji penentuan kadar flavonoid total dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Sedangkan untuk waktu penelitiannya dilaksanakan mulai dari bulan Februari 2021 hingga Mei 2021.

C. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bagian bunga yang merupakan bagian dari tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum*) yang diperoleh di Desa Candilopo, Banyubiru, Dukun, Magelang, Jawa Tengah.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah seri kadar, standar kuersetin, fraksi pelarut bunga cengkeh, dan jenis pelarut yang digunakan.

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar flavonoid total dari ekstrak etanol dan fraksi bunga cengkeh.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah bagian tanaman yang digunakan (bunga cengkeh).

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) merupakan ekstrak yang diperoleh dari proses maserasi simplisia bunga cengkeh yang diperoleh dari Desa Candilopo, Banyubiru, Dukun, Magelang, Jawa Tengah dengan menggunakan pelarut etanol 70%.
2. Kandungan ekstrak etanol bunga cengkeh yang paling dominan adalah senyawa flavonoid.
3. Flavonoid total ialah jumlah kandungan dari total senyawa flavonoid yang berasal dari suatu tumbuhan, yang dapat dilakukan dengan metode analisis kuantitatif.
4. Analisis kuantitatif dari senyawa flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Metode ini merupakan cara tunggal yang sering dimanfaatkan untuk menentukan senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid mempunyai cincin aromatis yang terkonjugasi dan dapat menunjukkan pita serapan yang kuat pada daerah UV-Vis.

F. Alat dan Bahan

1. Alat yang digunakan

Alat-alat gelas, neraca analitik (Ohaus), tabung reaksi (Pyrex'Iwaki), spatula besi, wajan, kompor listrik, batang pengaduk, Vakum Buchner

(Rocker), pipet volume, *chamber* KLT, penjepit kayu, corong pisah (Iwaki), thermometer, hotplate dan *magnetic stirrer*, Oven (Memmert UN160), Watherbath (Memmert WNB10FC), UV *Viewing Cabinet* (Lokal UvOC-02), dan Spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer).

2. Bahan yang digunakan

Bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*), etanol 70% (teknis), etanol (*p.a*), n-heksan (teknis), etil asetat (teknis), akuades, n-heksan (*p.a*), etil asetat (*p.a*), kertas saring, silika gel F254 (E. Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany), kuersetin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), HCl (*p.a*), pereaksi mayer, pereaksi wagner, pereaksi dragendrof, serbuk magnesium, petroleum eter (*p.a*), asam asetat anhidrat (*p.a*), asam sulfat pekat (*p.a*), FeCl₃, asam asetat 5% dan AlCl₃ (*p.a*).

3. Metode Pengumpulan Data

a. Determinasi tanaman

Determinasi bertujuan untuk mengetahui keaslian identitas dari suatu tanaman bunga cengkeh. Determinasi dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dengan nomor surat 014979/S.Tb./III/2021.

b. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari Desa Candilopo, Banyubiru, Dukun, Magelang, Jawa Tengah. Kemudian dilanjutkan beberapa tahap yaitu pengeringan dan penyerbukan simplisia. Proses pengeringan dilakukan dibawah sinar matahari langsung dan di atasnya diberikan kain hitam dan untuk proses penyerbukan dilakukan dengan mesin penggilingan yang kemudian diayak menggunakan ayakan 200 mesh. Setelah itu ditimbang sesuai kebutuhan dan dilanjutkan proses ekstraksi.

Ekstraksi serbuk bunga cengkeh dilakukan dengan teknik maserasi. Ekstraksi dengan metode maserasi dapat dilakukan dengan cara merendam simplisia kedalam suatu pelarut yang sesuai dengan

perbandingan tertentu. Serbuk bunga cengkeh ditimbang sebanyak 250 gram, lalu dimasukkan dalam toples dan ditambahkan 2,5 liter etanol 70%. Kemudian serbuk bunga cengkeh dimaserasi selama 3 hari. Setelah 3 hari maserasi, disaring menggunakan kain putih filtrat ditampung pada wadah lain (filtrat 1) sedangkan ampas diremaserasi dengan penambahan 2,5 liter etanol 70% selama 3 hari. Setelah hari ke-3 dilakukan proses penyaringan dengan kain, kemudian filtrat yang diperoleh dicampurkan dengan filtrat 1. Setelah itu dipekatkan hingga diperoleh ekstrak etanol bunga cengkeh. Kemudian dihitung rendemen ekstrak yang dinyatakan dalam persen dan dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ Ekstrak rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat simplisia atau ekstrak awal}} \times 100\%$$

c. Fraksinasi

Proses fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair (ECC) yang sepenuhnya bertujuan untuk mengisolasi kelompok utama kandungan senyawa yang diinginkan berdasarkan tingkat kepolarannya. Proses fraksinasi menggunakan 3 pelarut yang sesuai dengan tingkat kepolarannya yaitu n-heksan yang bersifat non-polar, etil asetat yang bersifat semi polar dan air yang bersifat polar. Sebanyak 5 gram ekstrak kental bunga cengkeh dilarutkan dalam 50 mL air panas dengan suhu 60°C. Kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 25 mL n-heksan, corong pisah ditutup kemudian dikocok perlahan selama 5 menit sambil sesekali dibuka tutupnya lalu dibiarkan hingga terjadi pemisahan. Kedua lapisan dipisahkan kedalam wadah yang berbeda. Lapisan air dimasukkan kembali ke dalam corong pisah kemudian ditambahkan lagi n-heksan dengan jumlah yang sama dan dilakukan seperti langkah yang di atas hingga tiga kali. Fraksi n-heksan kemudian ditampung dalam satu wadah. Bagian air dimasukkan kembali ke dalam corong pisah, kemudian difraksinasi menggunakan etil asetat dengan cara yang sama seperti fraksinasi dengan n-heksan. Fraksi etil

asetat dan fraksi air ditampung dalam wadah yang berbeda, ketiga fraksi selanjutnya dipekatkan lagi dan dihitung rendemen fraksi terhadap ekstrak kental dan simplisia kering.

d. Analisis Kualitatif

1) Uji Organoleptik

Uji Organoleptik dilakukan dengan maksud atau tujuan untuk memberikan gambaran awal atau pengenalan awal ekstrak yang sederhana secara objektif. Prinsipnya yaitu dilakukan dengan menggunakan alat indera meliputi: indera pengelihatan, indera peraba, indera perasa dan indera penciuman, yang kemudian akan didiskripsikan dalam beberapa poin yaitu sebagai berikut:

- a. Tekstur: padat, serbuk kering, kental, cair.
- b. Warna: kuning, coklat, dll.
- c. Bau: aromatik, khas, tidak berbau, dll.
- d. Rasa: pahit, manis, kelat, dll.

(Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000)

2) Skrining Fitokimia

Berbagai tanaman obat yang sangat beragam memiliki suatu zat atau senyawa alami yang dibentuk dan terkandung di dalam tanaman tersebut. Senyawa aktif yang terdapat dalam tumbuhan diketahui melalui perlakuan dengan metode pemisahan, pemurnian, dan sudah melewati identifikasi kandungan di dalam tanaman dengan skrining fitokimia (Harborne JB., 1987). Dalam penelitian ini akan dilakukan skrining fitokimia yang meliputi beberapa uji, di antaranya:

a) Identifikasi Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditetesi dengan HCl 2 N secukupnya kemudian dipanaskan di atas penangas air diaduk hingga larut dan didinginkan pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan NaCl serbuk sambil diaduk, lalu larutan tersebut dibagi dalam masing-masing dropplate atau plat tetes. Tiap lubang dalam plat tetes ditambahkan dengan masing-

masing pereaksi. Pada penambahan pereaksi mayer hasilnya positif apabila membentuk endapan putih atau kuning. Pada penambahan pereaksi wagner hasil positif apabila terbentuk endapan coklat. Sedangkan pada penambahan pereaksi Dragendrof hasil positif apabila terbentuk endapan jingga.

b) Identifikasi Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan aquades dan serbuk magnesium. Hasil positif mengandung flavonoid apabila didapatkan hasil dengan warna kuning merah dan orange (flavon, kalkon dan auron).

c) Identifikasi Saponin

Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 mL aquadest dan dipanaskan di atas penangas air. Apabila terbentuk buih atau gelembung menunjukkan adanya saponin (atau positif mengandung saponin).

d) Identifikasi Terpenoid dan Steroid

Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan dalam tabung reaksi kecil, lalu dikocok dengan sedikit petroleum eter. Lapisan petroleum eter diambil lalu diteteskan pada plat tetes, dan dibiarkan sampai kering. Ditambahkan 1 tetes asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat pada lapisan petroleum eter kering. Hasil positif apabila terbentuk warna orange, merah atau kuning, namun apabila terbentuk warna hijau berarti positif termasuk golongan steroid.

e) Identifikasi Tanin

Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dikocok dengan air panas hingga homogen setelah itu ditambahkan FeCl_3 . Apabila hasil yang diperoleh berwarna biru atau biru-hitam, berarti mengandung tanin pirogalol, namun apabila hasilnya berwarna hijau atau biru-hijau dan endapan berarti termasuk tanin katekol.

3) Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi flavonoid secara kualitatif menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dengan tujuan untuk memisahkan senyawa yang terlarut dalam sampel atau ekstrak. Fase gerak (eluen) yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kloroform: metanol: asam asetat glasial (9:1:0,5 v/v/v) sedangkan fase diam yang digunakan adalah silika gel F254. Pembanding yang digunakan adalah kuersetin. Menurut (Lipsy, 2010) nilai Rf kuarsetin sebesar 0,59 dan dikatakan bahwa senyawa tersebut memiliki karakteristik yang mirip atau sama dalam mengidentifikasi senyawa. Disiapkan silika gel dengan panjang 7 cm, lebar 5 cm dan diberikan batas atas dan bawah 1 cm. Agar fase gerak yang digunakan dapat mengelusi sampel dengan baik dan mempercepat reaksi, maka sebelum pengelusian fase gerak dalam *chamber* dijenuhkan terlebih dahulu. Kemudian ekstrak dan kuersetin (pembanding) ditotolkan pada fase diam atau silika gel dan dimasukkan dalam *chamber* secara hati-hati. Proses pengelusian selesai ditandai ketika pelarut naik hingga batas garis atas, kemudian silika gel dikeringkan dan kemudian dilihat bercak atau noda di bawah sinar UV 254 nm dan 365 nm. Menurut Santosa & Haresmita (2015) senyawa flavonoid berfluoresensi pada sinar UV 365 nm dan menunjukkan fluorosensi kuning, hijau atau biru. Kemudian dihitung nilai Rf dengan rumus:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

e. Analisis Kuantitatif

Penetapan kadar flavonoid total dilakukan dengan pengujian analisis kuantitatif untuk menghitung kadar senyawa flavonoid yang terkandung dalam bunga cengkeh dengan spektrofotometri UV-Vis.

1) Pembuatan Larutan Baku Standar Kuersetin

Ditimbang seksama 10 mg kuarsetin baku. Dilarutkan dalam pelarut etanol *p.a* 50 mL hingga larut. kemudian ditambahkan volumennya dalam labu takar 100 mL sampai garis tanda batas, lalu dilakukan pengojokan hingga homogen sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm.

2) Optimasi Panjang Gelombang Maksimum

Diambil larutan kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan 1 mL aluminium klorida 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Selanjutnya diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 350-450 nm (Das et al., 2014).

3) *Operating Time*

Diambil larutan kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm sebanyak 1 mL, lalu ditambahkan 1 mL aluminium klorida 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Ditunggu beberapa saat (± 5 menit), kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh sebesar 430 nm dengan nilai interval 2 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil.

4) Penentuan Linearitas Kurva Kalibrasi Kuarsetin

Dibuat seri kadar menggunakan kuersetin sebagai baku standar. Penentuan kurva baku kuersetin dibuat seri kadar sebesar 20, 40, 60, 80, 100 ppm. Diambil larutan seri kadar masing-masing konsentrasi sebanyak 1 mL kemudian direaksikan dengan 1 mL aluminium klorida 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Selanjutnya diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum dan dibuat kurva kalibrasi antara konsentrasi dengan nilai absorbansi. Penentuan kurva kalibrasi baku pembanding menggunakan rumus: $y = bx + a$ (Azizah et al., 2014).

5) Penentuan Kadar Flavonoid Total Dari Sampel

Sampel ekstrak etanol bunga cengkeh dan ketiga fraksi (etil asetat, n-heksan dan air) dibuat dengan konsentrasi 30% yaitu 30 mg

sampel dalam 10 ml etanol *p.a.* Diambil sampel masing-masing sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan 1 mL aluminium klorida 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Selanjutnya diukur absorbansi pada spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dan dicatat hasil nilai absorbansinya. Konsentrasi flavonoid dalam sampel akan ditentukan berdasarkan persamaan regresi linier dari kurva baku standar kuersetin. Kadar flavonoid dalam sampel dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar flavonoid} = \frac{\text{Kadar terhitung} \times \text{Volume total}}{\text{Berat sampel}}$$

G. Pelaksanaan Penelitian

Tabel 3. Pelaksanaan Penelitian

No	Jenis Kegiatan	Minggu Ke			
		I	II	III	IV
Januari					
1.	Pembuatan Proposal				
2.	Revisi Proposal				
Februari					
1.	Sidang Proposal				
2.	Revisi Proposal				
Maret					
1.	Pengurusan Surat Penelitian ke bagian Universitas				
2.	Pengurusan Surat Laboratorium Farmasi ke Bagian Kepala LAB				
3.	Penyiapan alat dan bahan				
4.	Ekstraksi				
April					
1.	Pemekatan dan Fraksinasi				
2.	Skrining Fitokimia				
3.	Optimasi KLT				
4.	Pembuatan Larutan Baku Standar dan Optimasi panjang gelombang				
5.	Pembuatan Kurva Baku Standar				
6.	Penentuan Kadar Flavonoid Total dari Sampel				

No	Jenis Kegiatan	Minggu Ke			
		I	II	III	IV
7.	Penggulangan Fraksinasi dan Skrining Fitokimia				
8.	Optimasi KLT				
Mei					
1.	Penentuan Kadar Flavonoid Total dari Sampel				
2.	KLT dan Semprot larutan pereaksi				
3.	Analisis Data				
4.	Penyusunan Laporan Akhir				
Juni					
1.	Penyerahan Hasil Analisis Data				
2.	Revisi Laporan Hasil Penelitian				
Juli					
1.	Sidang Hasil penelitian				
2.	Revisi Laporan Hasil Sidang				

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Analisis kadar flavonoid total dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis dengan 3 kali replikasi, hasil yang didapatkan berupa nilai absorbansi dan dihitung dengan memasukkan ke dalam persamaan garis linear $y = bx + a$ yang diperoleh dari kurva baku standar kuersetin. Kurva standar diperoleh dari hubungan antara konsentrasi kuersetin (mg/L) dengan nilai absorbansi. Kemudian analisis data secara statistik yang dilakukan dengan Uji *One-Way ANOVA* yang menggunakan Software SPSS (*Statistical Package for Social Science*). Sebelumnya dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan uji *levene* ragam data atau statistic. Namun apabila salah satu atau kedua asumsi tidak terpenuhi maka uji *One-way ANOVA* tidak boleh dilakukan, maka alteratifnya menggunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*.