

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan pengujian eksperimental dengan metode kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif dengan pereaksi FeCl_3 dan analisis kuantitatif dengan menghitung total tanin menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Total tanin yang diperoleh dinyatakan dalam mg TAE/g sampel.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Percobaan dilakukan di Laboratorium Kimia, Prodi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani. Penelitian ini akan dilakukan pada Juni – Juli 2024

C. Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan daun kersen yang memiliki ciri-ciri sesuai dengan kriteria daun kersen yang baik yaitu memiliki warna hijau tua urutan ke 3-6 dari pucuk. Tanaman kersen diperoleh dari pekarangan Kampus 2 Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Hal yang dianalisis dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kersen yang diekstraksi dengan metode UAE.

2. Variabel terikat

Hal yang dianalisis dalam penelitian ini adalah kandungan tanin total pada ekstrak daun kersen.

3. Variabel kontrol

Faktor yang kontrol yaitu jenis daun kersen, waktu panen, suhu pengeringan, ukuran partikel simplisia, konsentrasi dan jenis pelarut, metode ekstraksi, waktu ekstraksi, suhu ekstraksi dan suhu pengentalan.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Jenis pelarut yang diukur berdasarkan jenis bahan kimia yang digunakan dalam proses ekstraksi daun kersen, etanol 70% adalah pelarut yang akan digunakan.
2. *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE) dipilih sebagai metode ekstraksi untuk mengambil senyawa dari sampel pada penelitian ini.
3. Senyawa standar yang dipakai dalam penentuan kadar tanin total adalah asam tanat.
4. Tanin total dinyatakan sebagai mg TAE (*Tannic Acid equivalent*) per gram sampel.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Ayakan nomor 40 mesh, batang pengaduk, *Beaker glass* (*Iwaki*), grinder (Fomac), corong kaca, erlenmeyer, gelas ukur (*Iwaki*), labu takar (*Iwaki*), mikropipet (Ohaus), neraca analitik (Ohaus PA224), oven (Mettler UN160), pipet tetes, rak tabung reaksi, spatula, spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 10S) dan tabung reaksi (*Iwaki*).

2. Bahan

Asam tanat (pro analisis), akuades, daun kersen, etanol (pro analisis), etanol 70% (teknis), FeCl_3 (pro analisis), kain mori, pereaksi *Folin-Ciocalteu* (merck) dan Na_2CO_3 35% (pro analisis).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan bahan dan determinasi tanaman

Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang digunakan diperoleh dari pekarangan Kampus 2 Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Pengambilan daun dengan kriteria berwarna hijau, ujung berbentuk runcing, bentuk daun mendatar dan tepi daun bergerigi (Sulaiman *et al.*, 2017). Pengambilan daun dilakukan pada pagi hari pukul 06.00 WIB-10.00 WIB (Sari, 2022). Determinasi dilakukan dengan melampirkan foto atau gambar

tanaman lengkap beserta bagian-bagiannya yang meliputi daun, batang, bunga, buah. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Ilmu Terapan, Universitas Ahmad Dahlan.

2. Pembuatan simplisia daun kersen

Daun kersen dikumpulkan dan dicuci dengan air mengalir kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil untuk mempermudah proses pengeringan dan dikering anginkan. Selanjutnya, daun kesen dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C hingga kering. Daun kersen kering ditandai dengan rapuh atau hancur saat digenggam. Selanjutnya, simplisia daun kersen dihaluskan dengan grinder dan diayak dengan ayakan 40 mesh (Sari, 2022).

3. Pembuatan ekstrak daun kersen

Sebanyak 200 gram serbuk daun kersen direndam ke dalam botol kaca 500 mL dengan 2 Liter etanol 70% (perbandingan 1:10), dibagi menjadi 4 bagian dengan masing-masing botol berisi 50 gram serbuk yang dilarutkan dalam 500 mL etanol 70%. Proses ekstraksi menggunakan metode UAE selama 10 menit dan suhu 40°C. Penyaringan dengan kain mori dilakukan untuk memisahkan ampas dari filtratnya. Selanjutnya, filtrat dimasukkan ke cawan porselin dan dipekatkan dengan *waterbath* pada suhu 40°C untuk menghasilkan ekstrak kental daun kersen (Sari, 2022). Ekstrak kental ditimbang lalu dihitung rendemen menggunakan rumus berikut (Fiana *et al.*, 2020):

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia awal}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

4. Uji organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan untuk mengidentifikasi karakteristik ekstrak yang jelas dan obyektif berupa tekstur, warna dan bau.

5. Penetapan kadar air

Kadar air ekstrak diukur dengan menggunakan alat *moisture balance*. Ditimbang 1 gram ekstrak kemudian ekstrak dimasukkan ke dalam alat. Diatur suhu 105°C dan dibaca hasil kadar yang tertera pada layar

(Candraningsih *et al.*, 2022). Syarat kadar air yang baik yaitu tidak lebih dari 10% (Wijaya & Noviana, 2022).

6. Identifikasi senyawa tanin secara kualitatif

Sebanyak 10 mg ekstrak daun kersen dicampur dengan 1 mL akuades dan 2 tetes larutan FeCl_3 1% dalam tabung reaksi. Hasil menunjukkan positif tanin jika berwarna biru kehitaman dan hijau kecoklatan (Noer *et al.*, 2018).

7. Pengujian kandungan total tanin

a. Pembuatan larutan asam tanat 1000 ppm

Sebanyak 10 mg asam tanat dilarutkan dalam akuades hingga mencapai volume 10 mL dalam labu ukur sehingga menghasilkan larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan stok ini kemudian diencerkan dengan akuades untuk menghasilkan seri kadar 40, 60, 80, 100 dan 120 ppm dalam labu takar volume 5 ml (Wibisono, 2023).

b. Larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) 35%

Sebanyak 35 gram Na_2CO_3 ditimbang lalu dilarutkan dalam labu ukur 100 mL dengan akuades hingga semua larut menggunakan sonikator, kemudian dicukupkan volume sampai tanda batas dan dihomogenkan (Nofita & Dewangga, 2022).

c. Penetapan panjang gelombang maksimum

Sebanyak 4 mL akuades dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampurkan larutan asam tanat 80 ppm sebanyak 250 μL lalu ditambahkan 250 μL reagen *Folin Ciocalteu* dan Na_2CO_3 35% sebesar 500 μL . Campuran digojog hingga homogen dan dibiarkan bereaksi. Kemudian absorbansi larutan dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm (Wibisono, 2023).

d. Penentuan *operating time* (OT)

Sebanyak 4 mL akuades dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampurkan larutan asam tanat 80 ppm sebanyak 250 μL lalu ditambahkan 250 μL reagen *Folin Ciocalteu* dan Na_2CO_3 35% sebesar 500 μL . Campuran digojog hingga homogen dan dibiarkan bereaksi. Absorbansi dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang

gelombang maksimum yang diperoleh sebelumnya. Penentuan *operating time* dilakukan selama 1 jam dengan interval waktu 1 menit (Wibisono, 2023).

e. Pengukuran larutan standar asam tanat

Sebanyak 250 μL masing-masing larutan standar konsentrasi 40, 60, 80, 100 dan 120 ppm dimasukkan ke tabung reaksi kemudian dikombinasikan dengan akuades 4 mL dengan gelas ukur lalu ditambahkan 250 μL pereaksi *Folin Ciocalteu* dan 500 μL Na_2CO_3 35%. Larutan ditempatkan pada tempat gelap selama waktu *operating time* yang diperoleh dan dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum. Nilai absorbansi yang diperoleh akan digunakan untuk membuat kurva kalibrasi (Wibisono, 2023).

f. Pembuatan larutan sampel

Dibuat larutan sampel konsentrasi 1.000 ppm dengan cara ditimbang 10 mg ekstrak kemudian dilarutkan dalam etanol p.a hingga 10 mL (Wibisono, 2023).

g. Analisis kadar tanin

Sebanyak 250 μL ekstrak etanol 70% dilarutkan dengan akuades 4 mL, ditambahkan 250 μL larutan reagen *Folin Ciocalteu* dan Na_2CO_3 sebanyak 500 μL . Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama *operating time* yang diperoleh dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Pengujian diulang sebanyak 3 kali (Wibisono, 2023).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

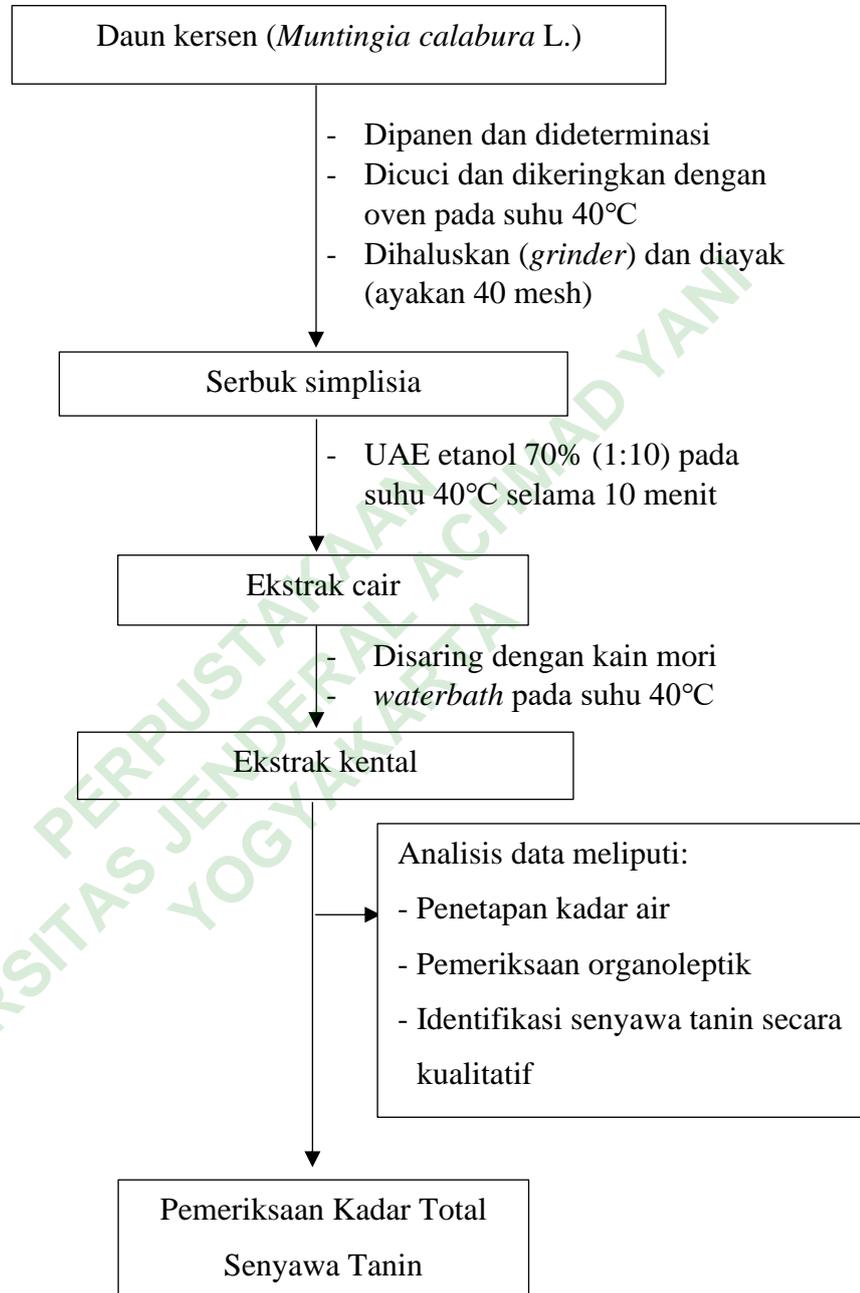
1. Penetapan kadar total tanin

Analisis hasil penetapan kadar total tanin pada ekstrak etanol 70% daun kersen dianalisis dengan menghitung persamaan regresi linier $y = bx + a$. Sumbu y mewakili nilai absorbansi larutan dan sumbu x mewakili konsentrasi (ppm atau mg/L). Dalam analisis kadar tanin ini digunakan standar asam tanat dan kandungan senyawa tanin dihitung dalam satuan mg TAE/gram. Nilai

kadar tanin yang direplikasi sebanyak 3x akan disajikan dalam bentuk tabel yang memuat nilai rata-rata \pm SD. Rumus perhitungan total tanin menurut Wibisono (2023) menggunakan persamaan 2.

$$\text{Kadar tanin total} = \frac{\text{kadar terhitung} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \times \text{volume total (mL)}}{\text{berat sampel (g)}} \dots\dots\dots(2)$$

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA

SKEMA PENELITIAN**Gambar 7. Skema Penelitian**