

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan analisis kualitatif dan kuantitatif. Ekstraksi dijalankan dengan metode *UAE* menggunakan pelarut etanol 96%. Penentuan kadar senyawa tanin menggunakan larutan standar asam tanat. Pada proses pengukur kadar senyawa tanin dilakukan dengan spektrofotometri *UV-Visible*. Total tanin dinyatakan dalam mgTAE/g sampel.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian bertempat di Laboratorium Kimia Prodi Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta dilakukan pada bulan Mei sampai Juli 2024.

C. Sampel Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan sampel bahan alam berupa daun kersen yang memenuhi persyaratan, meliputi daun yang bewarna hijau tua (urutan ke-3 sampai ke-6 dari pucuk kersen), daun yang mendatar, tepi daun bergerigi, serta pucuk daun berbentuk runcing. Tanaman kersen yang digunakan didapatkan dari area kampus 2 Fakultas Kesehatan UNJAYA yang berada di Desa Ambarketawang Kecamatan Gamping, Sleman, DIY (Sari dkk., 2022).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : kadar tanin ekstrak etanol 96%.
2. Variabel terikat : kadar total tanin (mgTAE/g sampel).
3. Variabel terkontrol : waktu panen, suhu dan waktu ekstraksi, penguapan ekstrak.

E. Definisi Operasional

1. Asam tanat berfungsi sebagai senyawa pembanding untuk menentukan kadar tanin dalam ekstrak daun kersen yang di ekstraksi dengan pelarut etanol 96%.

2. Kadar senyawa tanin pada penelitian ini adalah jumlah total senyawa tanin pada daun kersen yang diekstraksi dengan pelarut etanol 96%.
3. Metode ekstraksi yang diterapkan didalam penelitian ialah UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*).
4. Pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi daun kersen adalah etanol 96%.

F. Alat dan Bahan

1. Alat: Ayakan nomor 40 mesh, *beaker glass*, batang pengaduk, botol ekstrak, corong kaca, *grinder*, erlemeyer (*Iwaki*), gelas ukur (*Iwaki*), kuvet, kaca arloji, kompor listrik, labu takar (*Iwaki*), mikropipet (*Eppendorf*), *moisture balance*, neraca analitik (*Ohaus*), oven (*Memmert UNI60*), pipa kapiler, pipet ukur, pipet tetes, plat tetes, propipet, rak tabung reaksi, spatula/sendok besi, spektrofotometri *UV-Vis double beam (TSG 10S)*, tabung reaksi, *ultrasonic chamber*, wajan.
2. Bahan: Ekstrak daun kersen, etanol 96% (teknis), etanol (*p.a*), asam tanat, akuades pereaksi FeCl_3 (*p.a*), Na_2CO_3 35 % (Natrium Karbonat), pereaksi *Folin Ciocalteu*, kertas label, kertas saring.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan bahan tanaman

Tanaman kersen diambil di area kampus 2 Fakultas Kesehatan UNJAYA yang berada di Desa Ambarketawang Kecamatan Gamping, Sleman, DIY. Daun kersen yang dipilih adalah daun tanaman kersen yang berwarna hijau tua (urutan ketiga hingga enam dari pucuk). Daun harus segar dan tidak dirusak oleh hama. Pemanenan daun kersen dilaksanakan pagi hari sekitar jam 07.00 hingga 10.00 WIB, karena pada saat itu daun kersen masih belum terjadi reaksi fotosintesis (Sari, 2022).

2. Penyiapan sampel

Daun kersen yang sudah di panen, selanjutnya disortasi basah untuk memisahkan dari berbagai cemaran yang menempel dan dicuci sampai bersih dengan air bersih yang mengalir. Selanjutnya sampel daun kersen dikering

inginkan kemudian dikeringkan menggunakan oven yang diatur temperaturnya 50°C selama 48 jam hingga kering yang bertujuan untuk mengurangi kadar air pada sampel. Ketika daun menjadi rapuh saat digenggam, itu menandakan bahwa daun telah mengering atau kadar air di dalamnya telah berkurang secara signifikan. Kadar air yang tinggi dapat menimbulkan kerusakan pada sampel karena menimbulkan jamur. Setelah daun kersen kering, dihaluskan dengan grinder hingga berbentuk serbuk agar memperkecil partikel dan proses penyerapan menghasilkan ekstrak yang banyak. Selanjutnya, diayak dengan ayakan 40 mesh, agar simplisia mendapatkan ukuran yang seragam sehingga proses ekstraksi lebih maksimal (Sari, 2022).

3. Ekstraksi sampel

Sampel daun kersen di ekstraksi dengan metode UAE menggunakan pelarut etanol 96% (1:10) selama 10 menit dengan suhu 40°C. ekstraksi dengan UAE dilakukan sebanyak 4 kali *running*, yang dilakukan dengan cara diambil 50 gram serbuk daun kersen dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 500 mL sampai seluruh bahan terendam sempurna. Filtrat yang dihasilkan kemudian dipekatkan dengan penangan air pada suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak kental (Sari, 2022). Ekstrak kental daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang dihasilkan kemudian dilakukan perhitungan nilai rendemannya dengan rumus

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

4. Pemeriksaan organoleptis

Ekstrak kental daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang dihasilkan kemudian diuji organoleptis meliputi pemeriksaan seperti aroma, warna dan bentuk ekstrak.

5. Penentuan kadar air ekstrak

Uji kandungan kadar air ini menggunakan alat *moisture balance*. Lakukan pengujian dengan alat *moisture balance* dengan memasukkan 1 gram ekstrak kental dalam alumunium foil kemudian ditimbang dan kadar airnya diukur dengan menekan tombol start dan suhu pada 105°C sampai didapatkan persen kadar air. Dilakukan 3 kali pengukuran sampai mendapatkan hasil tetap dalam

3 kali pengulangan. Syarat kadar air ekstrak yang baik adalah pada nilai rentang lebih dari 10% (Syabania dkk., 2021).

6. Identifikasi senyawa tanin secara kualitatif.

Pengujian ini merupakan tahap awal dalam penelitian untuk mengidentifikasi kandungan senyawa tanin dalam ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.). Pada pengujian ini digunakan asam tanat sebagai kontrol positif. Standar asam tanat dan ekstrak daun kersen, masing-masing ditimbang 100 mg dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 mL akuades dan 2 tetes besi (III) klorida 1%. Hasil positif mengandung tanin jika sampel berwarna biru kehitaman pada standar (Sari dkk., 2022). Hasil dinyatakan positif mengandung tanin apabila sampel berubah warna menjadi hijau kecoklatan

7. Penentuan kadar total tanin ekstrak daun kersen (*Muntingia Calabura* L.)

a. Pembuatan larutan standar asam tanat 1000 ppm

Asam tanat 10 mg dilarutkan dalam akuades hingga volume 10 mL didalam labu takar sehingga dihasilkan larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm. Disiapkan larutan stok dalam seri konsentrasi 40, 60, 80, 100 dan 120 ppm. Dengan cara mengambil masing-masing 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL, dan 0,6 mL dari larutan stok, dimasukkan ke dalam labu takar setelah itu add 5 mL akuades (Wibisono, 2023).

b. Pembuatan larutan natrium karbonat 35%

Ditimbang 35 gram (Na_2CO_3) ad akuades secukupnya dimasukkan ke dalam labu takar tambahkan akuades hingga volume mencapai 100 mL. Kemudian disonikasi untuk mamaksimalnkan kelarutan Na_2CO_3 (Wibisono, 2023).

c. Penentuan panjang gelombang maksimum

250 μL larutan asam tanat 80 ppm ditambahkan 4 mL akuades dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 250 μL reagen *Folin-Ciocalteu* dan larutan Na_2CO_3 jenuh sebanyak 500 μL ke dalam tabung reaksi tersebut. Reagen dalam tabung reaksi kemudian diaduk hingga homogen dan absorbansi larutan diukur menggunakan

spektrofotometer UV-Vis dengan rentang panjang gelombang 400-800 nm (Wibisono, 2023). Diperoleh Panjang gelombang maksimum pada 757 nm.

d. Penentuan *Operating time (OT)*

250 μL larutan asam tanat 80 ppm ditambahkan 4 mL akuades dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 250 μL reagen *Folin-Ciocalteu* dan 500 μL larutan Na_2CO_3 35% ke dalam tabung reaksi digojog hingga homogen. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 757 nm dengan frekuensi pengukuran 1 menit selama 1 jam hingga mendapat nilai absorbansi stabil (Wibisono, 2023). Diperoleh *operating time* pada menit ke-35.

e. Pembuatan kurva baku standar asam tanat

Diambil 250 μL setiap konsentrasi larutan standar 40, 60, 80, 100 dan 120 ppm asam tanat, dimasukkan ke dalam labu ukur. Ditambahkan 4 mL akuades, 250 μL reagen *Folin Ciocalteu*, dan 500 μL larutan Na_2CO_3 35%. Campuran diaduk hingga homogen dan d Diamkan selama 35 menit dan d Diamkan di dalam tempat yang gelap. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 757 nm. Selanjutnya kurva hubungan antara kadar asam tanat (ppm) dan absorbansi dibuat untuk analisis lebih lanjut (Wibisono, 2023).

f. Pembuatan larutan uji sampel

Diambil 10 mg ekstrak etanol larutkan dengan etanol *p.a* hingga 10 mL sehingga diperoleh larutan sampel konsentrasi 1000 ppm (Wibisono, 2023).

g. Penetapan kadar total tanin

Dibuat analit yang akan digunakan untuk penetapan kadar tanin total dengan cara diambil 250 μL ekstrak etanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 250 μL dan Na_2CO_3 tambahkan 4 mL akuades. Diinkubasi di suhu ruangan selama 35 menit dan absorbansinya dicek pada panjang gelombang 757 nm. Lakukan pengulangan sebanyak 3x agar didapatkan hasil yang konsisten (Wibisono, 2023).

H. Metode Pengelolaan dan Analisis Data

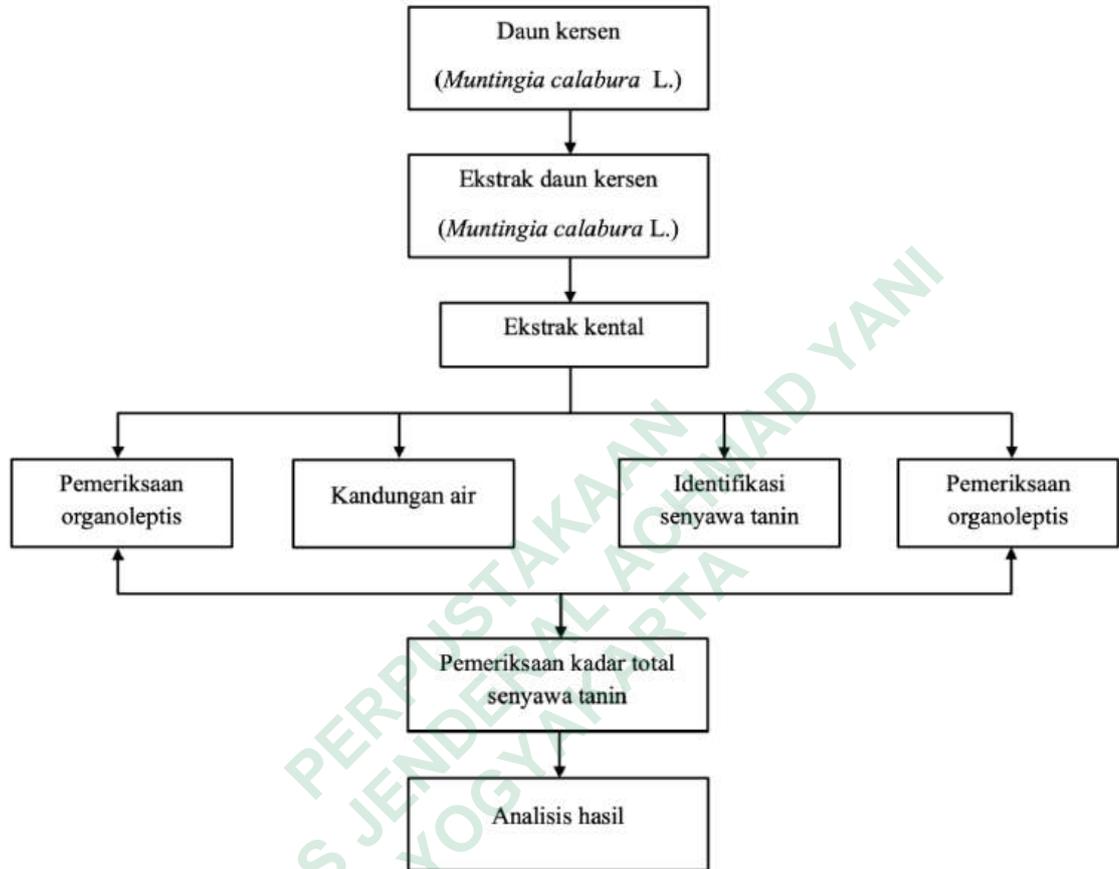
Analisis data uji total kadar tanin dilakukan dengan menghitung persamaan dari komponen ekstrak daun kersen yang diekstraksi dengan pelarut etanol 96%. Hitungan larutan sampel menggunakan persamaan linier, $y = bx + a$, (y) mewakili absorbansi dan (x) mewakili konsentrasi atau kadar senyawa. Persamaan linier dihitung dengan menggunakan *Microsoft Excel*, yang akan mendapatkan hasil kurva baku absorbansi versus konsentrasi. Penentuan kadar total senyawa tanin dihitung dengan rumus sebagai berikut: (Sari dkk., 2022)

$$\text{Kadar total tanin} = \frac{\text{kadar terhitung mg/ml} \times \text{Volume total (mL)}}{\text{Berat sampel (g)}} \dots\dots\dots(2)$$

PERPUSTAKAAN
JENDERAL ACHMAD YANI
UNIVERSITAS YOGYAKARTA

I. Alur penelitian

Bagan Alur Penelitian



Gambar 6. Bagan Alur Penelitian