

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Rencana penelitian ini merupakan jenis eksperimental laboratorium untuk menetapkan kadar flavonoid total dan kadar fenolik total ekstrak daun kelengkeng (*Dimocarpus longan* L.) dengan perbedaan suhu pada metode UAE. Penelitian ini dimulai dari pengumpulan simplisia, ekstraksi daun kelengkeng menggunakan metode UAE dengan perbedaan suhu antara 40°C, 50°C dan 60°C dalam waktu 20 menit. Penetapan kadar flavonoid total dan kadar fenolik total menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biofarmakologi Program Studi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan Mei-Juni 2025.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Daun kelengkeng (*Dimocarpus longan* L.) sebagai subjek penelitian didapatkan dari Kebun Kelengkeng PWR (Wisata Petik Buah) di Ringroad barat, Cibuk Kidul, Margoluwih, Kecamatan Seyegan, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta (titik koordinat -7.7524265, 110.3114948).

2. Sampel

Tanaman yang digunakan adalah daun kelengkeng yang memiliki warna hijau tua sedikit kehitaman dan masih segar (Ardiany dan Sa'ad., 2024). Daun kelengkeng yang diambil urutan ke-2, 3, 4 dan 5, dipanen sebanyak 5,7 kg. Proses panen dilakukan pada pagi hari pukul 07:00-10:00 WIB.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: Variasi suhu ekstraksi 40°C, 50°C dan 60°C dengan metode *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE).
2. Variabel terikat: Karakteristik daun, waktu panen, suhu pengeringan, pelarut, metode ekstraksi, waktu ekstraksi dan suhu pengentalan.
3. Variabel terbatas: Kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak daun kelengkeng (*Dimocarpus longan* L.).

E. Definisi Operasional

1. Metode ekstraksi *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE).

Metode ekstraksi ini menggunakan gelombang ultrasounik untuk meningkatkan efisiensi pengambilan senyawa bioaktif dari tanaman melalui proses kavitasi yang merusak dinding sel.
2. Suhu

Salah satu faktor penting yang mempengaruhi efektivitas proses ekstraksi dengan metode UAE untuk mendapatkan ekstrak dari kadar fenolik dan kadar flavonoid total.
3. Kuersetin

Senyawa flavonoid alami yang banyak ditemukan dalam tanaman yang digunakan sebagai standar untuk mengukur kadar flavonoid total pada KLT dan penetapan kadar flavonoid total yang dinyatakan dalam *QE (Quercetin Equivalen)*.
4. Asam galat

Senyawa fenolik alami yang banyak ditemukan dalam tanaman yang digunakan sebagai standar untuk mengukur kadar fenolik total yang dinyatakan dalam *GAE (Gallic Acid Equivalent)*.
5. Spektrofotometri UV-Vis

Merupakan teknik atau metode analisis yang menggunakan panjang gelombang UV (200-400 nm) dan visibel (400-800 nm) sebagai area serapan untuk mendeteksi senyawa pada panjang gelombang tertentu.

F. Alat dan Bahan

1. Alat :

Ayakan 40 mesh, *beaker glass* (iwaki), batang pengaduk, botol ekstrak (vial), chamber KLT, erlenmeyer (*iwaki*), gelas ukur (iwaki), grinder, kaca arloji, labu takar (*iwaki*), mikropipet (*Ohaus*), *moisture balance*, oven (*memmert*, UN160), pipet kapiler, pipet tetes, pipet volum (Iwaki), pipet ukur (Iwaki), propipet, spatula, sendok kaca, spektrofotometer UV-Vis *double beam* (Thermo Scientific Genesys 10S), tabung reaksi (*Iwaki*), timbangan analitik (*ohaus*), *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE) (cole pamer), *waterbath* (*Memmert*).

2. Bahan :

Simplisia daun kelengkeng, akuadest (Teknis), AlCl_3 (*Merck*), asam asetat (*Merck*), asam format (*p.a*), asam galat (*Merck*) *bluetip*, etanol 96% (Teknis), etil asetat, FeCl_3 (*Merck*), HCl pekat (*Mallinckrodt*), kertas saring, metanol (*Merck*), natrium karbonat (*Merck*), pereaksi *Dragendroff*, pereaksi *Mayer*, pereaksi *Wagner*, toluene (*Mallinckrodt*), reagen *Follin-Ciocalteu* (*Merck*), standar kuersetin (*Sigma*), *whitetip*, *yellowtip*.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi

Daun kelengkeng, diambil dari Kebun Kelengkeng PWR (Wisata Petik Buah) di Ringroad barat, Cibuk Kidul, Margoluwih, Kecamatan Seyegan, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta (titik koordinat -7.7524265, 110.3114948). Prosedur dimulai dengan pengumpulan 5,7 kg simplisia daun kelengkeng pada pagi hari dengan kriteria yang berwarna hijau tua pekat atau daun hijau tua sedikit kehitaman yang masih segar (Trisnaputri *et al.*, 2023) pada urutan ke 2, 3, 4 dan 5. Kemudian dilakukan determinasi tanaman daun kelengkeng dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan. Determinasi daun kelengkeng menggunakan foto dari satu pohon kelengkeng yang meliputi daun, ranting dan buah dengan tujuan untuk memastikan morfologi tanaman agar tidak

ada kesalahan dalam pengambilan sampel daun kelengkeng yang digunakan untuk penelitian (Dominica dan Handayani., 2019).

2. Persiapan Sampel

Daun kelengkeng yang sudah dipanen dilakukan sortasi basah. Setelah itu, daun kelengkeng dicuci menggunakan air mengalir sampai bersih dan dikering anginkan. Selanjutnya daun kelengkeng dikeringkan dengan oven menggunakan suhu 50°C selama 3 hari, atau dengan parameter daun kelengkeng sudah berwarna coklat tua dan hancur saat diremah (Utami *et al.*, 2015). Setelah kering, sampel daun kelengkeng diperkecil ukuran dengan *grinder* hingga menjadi serbuk. Serbuk diayak dengan ayakan dengan mesh 40, serbuk yang dihasilkan kemudian ditimbang dan ditempatkan dalam wadah kering yang tertutup rapat.

3. Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fikry *et al.* (2024) dengan modifikasi pada pelarut yang digunakan dan waktu ekstraksi. Sampel yang digunakan berupa serbuk daun kelengkeng dengan total 450 gram yang terbagi masing-masing 150 gram tiap variasi suhu. Ekstraksi tiap suhu dilakukan sebanyak 3 *batch* dengan masing-masing sampel 50 gram menggunakan 500 ml pelarut etanol 96 (1:10). Ekstraksi dilakukan dengan metode UAE selama 20 menit. Sampel yang dihasilkan dari masing-masing variasi suhu disaring dengan kain mori dan dilanjutkan dengan kertas saring sampai diperoleh filtrat, kemudian diuapkan menggunakan *waterbath* dengan suhu yang sama dengan proses ekstraksi yaitu 40±2°C, 50±2°C dan 60±2°C hingga terbentuk ekstrak kental, dan dihitung rendemen dengan persamaan 2 (Sekarsari *et al.*, 2019).

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

4. Organoleptik

Setelah dilakukan pengentalan daun kelengkeng dilakukan pengujian organoleptik untuk mengetahui kualitas suatu ekstrak yang meliputi bentuk, aroma dan warna.

5. Kadar air

Dimasukkan 0,5 gram ekstrak dari daun kelengkeng diletakkan diatas lempeng aluminium foil, lalu dimasukkan kedalam alat *Moisture Balance* dan diratakan. Setelah itu, alat dioperasikan pada suhu 105°C hingga indikator layar berubah menjadi hijau dan nilai pada layar berhenti, dan diperoleh data kadar air ekstrak daun kelengkeng. Kadar air yang memenuhi yakni kurang dari 10%.

6. Uji Penapisan Fitokimia

a. Identifikasi Senyawa Alkaloid

Ditimbang ekstrak daun kelengkeng seberat 10 gram pada masing-masing variasi suhu, kemudian sampel ekstrak pada masing-masing suhu dilarutkan dengan metanol dan disaring menggunakan kertas saring. Disiapkan tiga tabung reaksi, kemudian, diambil masing-masing sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam tiga tabung reaksi terpisah untuk dilakukan pengujian dengan reagen *Wagner*, reagen *Mayer*, dan reagen *Dragendorff*. Ditambahkan HCl 2N 2 ml dan ditambahkan beberapa tetes reagen pada tiap-tiap tabung reaksi hingga menunjukkan perubahan warna atau terbentuk endapan. Uji alkaloid dengan penggunaan pereaksi *Mayer* dianggap positif, ditandai dengan terbentuk endapan warna putih, sedangkan pereaksi *Wagner*, dmenunjukkan hasil positif ditandai dengan terbentuk endapan berwarna coklat, dan untuk pereaksi *Dragendorff*, hasil positif ditandai dengan terbentuk endapan dengan warna jingga kecokelatan (Nurhasanah *et al.*, 2024). Dikatakan mengandung alkaloid apabila 2 dari 3 pereaksi positif .

b. Identifikasi Senyawa Flavonoid

Ditimbang ekstrak daun kelengkeng sejumlah 0,5 gram, dan dilarutkan dengan metanol 10 ml. Setelah tercampur larutan disaring menggunakan kertas saring. Selanjutnya 2 mL filtrat sampel diambil dan dimasukkan 0,1 gram serbuk Mg, kemudian ditetesi dengan HCl pekat pada sisi tabung. Dinyatakan positif senyawa flavonoid jika larutan berubah warna jingga.

c. Identifikasi Senyawa Saponin

Ditimbang ekstrak daun kelengkeng sejumlah 10 mg dimasukkan pada

tabung reaksi. Selanjutnya dicampurkan 10 ml air mendidih dan digojog selama 10 detik hingga membentuk busa lalu didiamkan selama 1 menit. Jika senyawa mengandung saponin, busa yang terbentuk akan tetap stabil.

d. Identifikasi Senyawa Tanin

Ditimbang ekstrak daun kelengkeng sejumlah 10 mg dan dilarutkan dengan 2 ml metanol *p.a.*, kemudian larutan disaring menggunakan kertas saring. Diambil 1 ml campuran dan ditetesi dengan larutan FeCl_3 3% hingga larutan berubah warna, reaksi positif ditandai dengan pergantian warna dari biru hingga warna biru kehitaman. Cara pembuatan FeCl_3 3% adalah dengan 3 g FeCl_3 dilarutkan dalam 100 ml akuades.

e. Steroid

Ditimbang ekstrak daun kelengkeng sejumlah 10 mg dilarutkan dalam 0,5 ml kloroform lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat, selanjutnya melalui dinding tabung ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat. Bila terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

7. Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan KLT

Proses identifikasi senyawa flavonoid dilakukan Kromatografi Lapis Tipis. Fase gerak yang digunakan didapatkan melalui proses optimasi yakni toluen : etil asetat : asam format (5:4:1) sebanyak 10 ml. Standar yang digunakan kuersetin 10 mg dan dilarutkan dengan metanol *p.a.* ad hingga tanda batas pada labu takar 10 ml (1000 ppm). Sampel ekstrak daun kelengkeng dengan perbedaan variasi suhu antara (40°C, 50°C, dan 60°C) sebanyak 10 mg dilarutkan dengan metanol *p.a.* ad hingga tanda batas labu takar 10 ml (1000 ppm) dan disaring menggunakan kertas saring. Fase diam yaitu plat KLT *silica gel* F₂₅₄ ukuran 10 cm x 5 cm yang diaktifkan dengan di oven selama 10 menit suhu 105°C. Setelah plat KLT aktif dilakukan penotolon dengan volume masing-masing 3 µL menggunakan pipa kapiler 1 µL untuk standar dan sampel, kemudian dimasukkan plat KLT ke dalam chamber berisi fase gerak yang telah mencapai kondisi jenuh. Dibiarkan proses elusi terjadi secara sempurna. Plat KLT dikering anginkan dan dilihat dengan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Masing-

masing nilai R_f sampel dan standar kuersetin dapat dianalisa menggunakan persamaan 3 (Salamah dan Widyasari., 2015).

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh analit}}{\text{jarak tempuh pelarut}} \dots\dots\dots (3)$$

8. Penentuan kadar flavonoid

Penetapan kadar flavonoid total mengacu penelitian Chang *et al* (2002), dalam Nurhasanah *et al.*, (2024).

a. Pembuatan Larutan Baku Standar Kuersetin

Ditimbang serbuk kuersetin sejumlah 10 mg lalu ditambah metanol *p.a* hingga 10 mL untuk mendapatkan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian, dibuat larutan seri konsentrasi yaitu 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm dan 120 ppm (**Lampiran 10**). Diukur absorbansi masing-masing larutan pada panjang gelombang maksimum.

b. Pembuatan larutan CH₃COOH 5%

Sebanyak 5 ml CH₃COOH pekat dimasukkan ke dalam labu takar. Kemudian, ditambahkan akuades secukupnya ke dalam gelas beker hingga larut, lalu dimasukkan kedalam labu takar 100 ml dan ditambahkan akuades hingga tanda batas labu takar.

c. Pembuatan larutan AlCl₃ 10%

Sebanyak 10 gram AlCl₃ dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml. Kemudian, dilarutkan dengan akuades hingga volume total larutan mencapai 100 ml.

d. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Diambil larutan stok kuersetin 1 ml dari 80 ppm dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml, ditambahkan 1 ml AlCl₃ 10% dan ditambahkan CH₃COOH 5% hingga tanda batas. Kemudian dibaca absorbansinya pada rentang panjang gelombang 350-450 nm. Panjang gelombang maksimal ditandai dengan nilai absorbansi tertinggi.

e. Penentuan *Operating Time* (OT)

Diambil larutan stok kuersetin 1 ml dari konsentrasi 80 ppm dan

dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml, ditambahkan AlCl_3 10% sebanyak 1 ml dan ditambahkan CH_3COOH 5% hingga tanda batas. Pengukuran OT dilakukan selama 45 menit pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan sebelumnya dengan interval 1 menit hingga menghasilkan reaksi yang konsisten. Dikatakan stabil jika nilai absorbansi tetap pada rentang waktu tertentu.

f. Pembuatan Kurva Baku Standar Kuersetin

Diambil larutan stok kuersetin 1 ml dari konsentrasi 80 ppm dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml, ditambahkan 1 ml AlCl_3 10%, dan ditambahkan CH_3COOH 5% hingga tanda batas. Kemudian diinkubasi pada OT yang diperoleh dan dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum. Proses ini direplikasi sebanyak 3x.

g. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Ditimbang dengan seksama 100 mg ekstrak daun kelengkeng dari masing-masing variasi suhu (40°C , 50°C , dan 60°C) dan dilarutkan dalam metanol *p.a* ad 10 ml untuk mendapatkan konsentrasi 10.000 ppm. Dilakukan pengenceran pada setiap variasi suhu dengan mengambil 1 ml larutan ekstrak dan ditambahkan dengan metanol *p.a* dalam labu ukur 10 ml sehingga terhitung 10x pengenceran. Dimasukkan 1 ml dari setiap ekstrak ke dalam labu ukur yang terpisah, ditambahkan 1 ml AlCl_3 10%, ditambahkan hingga 10 ml dengan CH_3COOH 5%. digojog campuran hingga homogen dan diinkubasi pada OT yang diperoleh selama 33 menit. Dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang sudah didapatkan dan diulangi pengukuran sebanyak tiga kali. TFC (*Total Flavonoid content*) dinyatakan dalam rumus perhitungan kadar flavonoid pada persamaan 4 berikut:

$$\text{TFC} = \frac{\text{C.V.fp}}{\text{g}} \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan:

- TFC = *Total Flavonoid content* (mgQE/g)
 C = Konsentrasi flavonoid (ppm)
 V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)
 fp = Faktor pengenceran
 g = Berat sampel yang digunakan (g)

9. Penetapan Kadar Fenolik Total

Penetapan kadar fenolik total mengacu pada prosedur Chun *et al.*, (2003) dalam penelitian Nurhasanah *et al.*, (2024).

a. Pembuatan Seri Kadar Asam Galat

Dilartukan 10 mg dalam metanol *p.a* ad hingga tanda batas 10 mL, didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian, dilakukan pembuatan seri kadar 100, 150, 200, 250, 300, 350 dan 400 ppm lalu di ad 10 ml dengan metanol *p.a* (**Lampiran 11**).

b. Pembuatan Larutan Natrium Karbonat (Na₂CO₃) 7%

Sebanyak 7 gram Na₂CO₃ dimasukkan kedalam labu takar 100ml. Kemudian, ditambahkan akuades hingga tanda batas, dan dilakukan proses pencampuran dengan alat sonikator.

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan asam galat konsentrasi 300 ppm sebanyak 0,1 ml ditambahkan 0,1 ml reagen *Follin-Ciocalteu*, dan didiamkan selama 4 menit, lalu ditambahkan 1 ml Na₂CO₃ 7% dan ditambahkan dengan *water for injection* (WFI) hingga tanda batas dalam labu ukur 5ml. Dibaca absorbansi pada rentang panjang gelombang 600 nm sampai 800 nm. Panjang gelombang maksimal ditandai dengan nilai absorbansi tertinggi.

d. Penentuan *Operating Time* (OT)

Diambil larutan asam galat konsentrasi 300 ppm sebanyak 0,1 ml dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditambahkan dengan reagen *Follin-Ciocalteu* 0,1 ml, didiamkan selama 4 menit lalu ditambahkan larutan Na₂CO₃ 7% 1 ml, dan ad dengan WFI hingga tanda batas. Pengukuran OT dilakukan selama 2 jam pada panjang gelombang maksimum dengan interval

1 menit hingga menghasilkan reaksi stabil. Dikatakan stabil jika nilai absorbansi tetap pada rentang waktu tertentu.

e. Pembuatan Kurva Baku Standar Asam Galat

Diambil 0,1 ml pereaksi *Follin-Ciocalteu* dicampur dengan larutan baku standar asam galat pada setiap konsentrasi sebanyak 0,1 ml ke dalam labu ukur 5 ml dan digojog, setelah 4 menit ditambahkan sebanyak 1 ml Na_2CO_3 7% dan dikocok lalu ad WFI hingga tanda batas. Diinkubasi selama OT yang diperoleh pada suhu ruang lalu dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum dan diulangi 3 kali.

f. Penentuan Kadar Total Fenolik

Sebanyak 100 mg ekstrak daun kelengkeng pada masing-masing suhu 40°C , 50°C dan 60°C dilarutkan dengan metanol *p.a* pada labu ukur 10 ml hingga tanda batas (konsentrasi 10.000 ppm). Dilakukan pengenceran pada setiap variasi suhu dengan mengambil 1 ml larutan ekstrak dan ditambahkan dengan metanol *p.a* menggunakan labu ukur 10 ml sehingga terhitung 10x pengenceran. Lalu diambil 0,1 mL larutan ekstrak daun kelengkeng yang sudah dilarutkan, ditambahkan pereaksi *Follin- Ciocalteu* 0,1 mL dan dikocok hingga merata. Setelah itu, ditunggu dalam waktu 4 menit. Ditambahkan natrium karbonat 7% 1 ml dan WFI hingga volume 5 mL. Didiamkan pada suhu kamar selama OT. Dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum dan diulangi pengukuran sebanyak tiga kali. TPC (*Total Phenolic Content*) dinyatakan dalam rumus perhitungan kadar fenolik pada persamaan 5:

$$\text{TPC} = \frac{\text{C.V.fp}}{\text{g}} \dots\dots\dots (5)$$

Keterangan:

TPC = *Total Phenolic Content* (mgGAE/g)

C = Konsentrasi fenolik (ppm)

V = Total volume yang digunakan (mL)

fp = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g)

H. Metode Pengolahan Data

1. Analisis Kadar Fenolik Total dan Flavonoid Total

Analisis kadar fenolik dan flavonoid total dilakukan menggunakan persamaan regresi linier dengan persamaan (6).

$$y = bx + a \dots\dots\dots (6)$$

Keterangan :

y = absorbansi

b = intersep

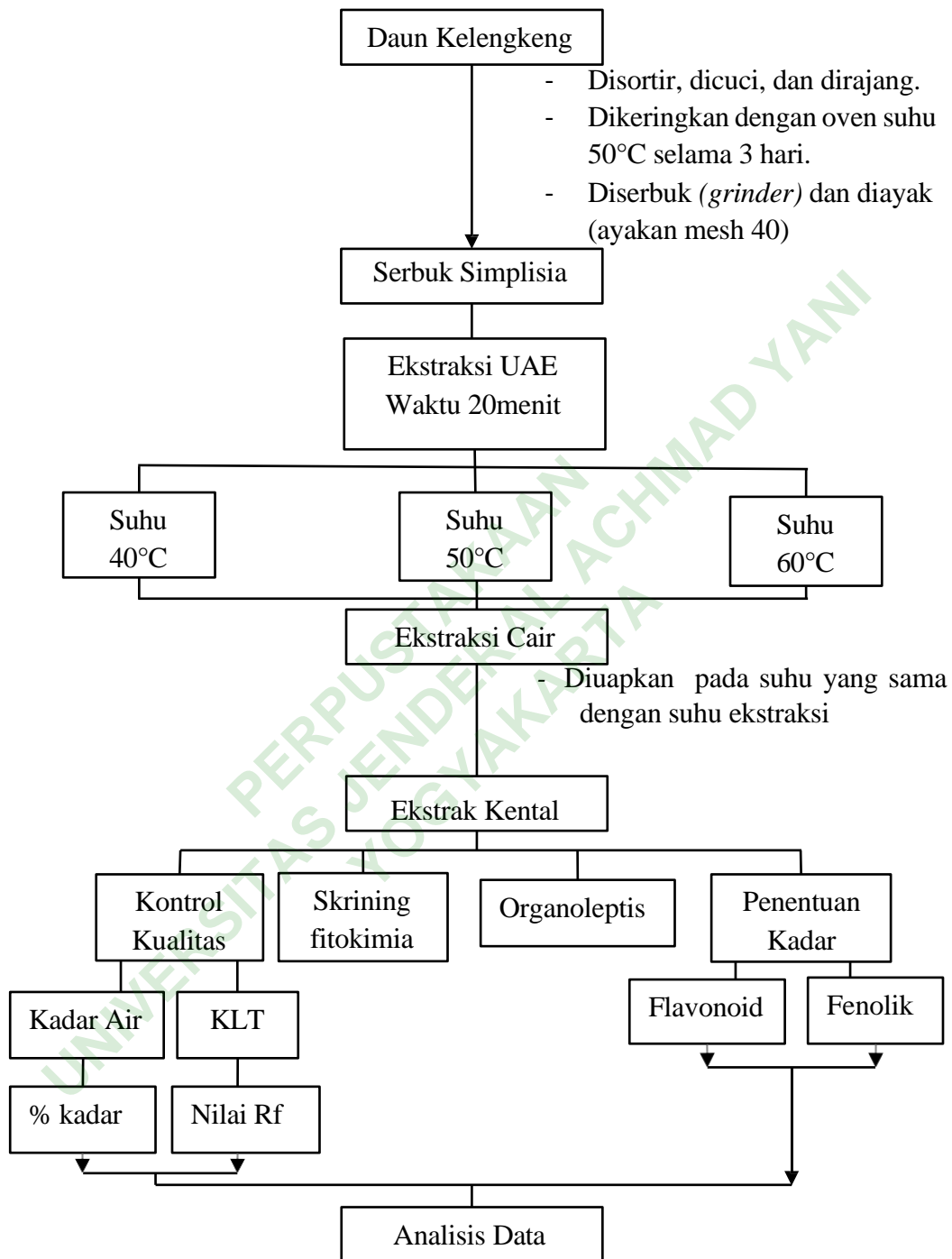
x = konsentrasi/kadar senyawa (ppm)

a = slope (kemiringan)

Setelah didapatkan persamaan $y = bx + a$ maka selanjutnya dilakukan analisis penetapan kadar fenolik dan flavonoid total dengan nilai x dihubungkan sebagai nilai konsentrasi (C) dari rumus kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak etanol 96% daun kelengkeng pada persamaan 4 dan 5.

2. Analisis Data

Pengolahan data secara statistik menggunakan SPSS untuk mengevaluasi pengaruh suhu ekstraksi terhadap kadar fenolik dan flavonoid total 40°C, 50°C, dan 60°C. Hasil nilai kadar fenolik dan flavonoid total ekstraksi daun kelengkeng dilakukan uji homogenitas data dengan *Levene test* sedangkan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk test*. Signifikansi kedua uji tersebut ditentukan dengan kriteria $p > 0,05$. Jika data memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas, maka dilakukan uji *One-Way ANOVA*, untuk melihat perbedaan dari variasi suhu ekstraksi.

Alur Penelitian :**Gambar 8. Alur Penelitian**