

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang digunakan dalam penelitian ini diekstraksi dengan metode UAE menggunakan pelarut metanol. Pada penelitian ini dilakukan uji secara kualitatif dan kuantitatif. Identifikasi senyawa tanin secara kualitatif berupa uji organoleptik, identifikasi senyawa tanin dengan pelarut FeCl₃ serta uji KLT dan uji kuantitatif berupa uji kadar total tanin dari ekstrak metanol daun kersen menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan asam tanat sebagai standar. Total tanin dinyatakan dalam mgTAE/g.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni-Juli 2024 di Laboratorium Kimia Farmasi Prodi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Dilakukan pengambilan sampel dengan menggunakan metode *purposive sampling*, artinya tidak dibandingkan dengan lokasi lain. Sampel diperoleh dari area Kampus 2 Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta, Kecamatan Gamping, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

2. Sampel

Sampel diambil sesuai dengan kriteria antara lain daun kersen yang memiliki warna hijau tua, daunnya mendatar, tepinya bergerigi dan memiliki ujung yang runcing (Sari, 2022).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas
Ekstrak metanol daun kersen.
2. Variabel terikat
Kadar total senyawa tanin yang terkandung dalam daun kersen.
3. Variabel kontrol
Pemilihan sampel, waktu pengambilan sampel, suhu pengeringan simplisia, waktu ekstraksi, suhu ekstraksi dan suhu pengentalan ekstrak.

E. Definisi Operasional

1. Asam tanat sebagai pembanding dalam penentuan kadar senyawa tanin.
2. Ekstraksi UAE dengan pelarut metanol untuk memperoleh ekstrak metanol daun kersen.
3. Daun kersen yang dipakai ialah daun yang memiliki warna hijau tua.
4. Sampel diambil pada pagi hari pukul 06.00-10.00 WIB.
5. Proses ekstraksi menggunakan suhu 40°C.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
Ayakan mesh no.40, gelas ukur (*Iwaki*), gelas beker (*Iwaki*), labu takar (*Iwaki*), kaca arloji, kertas saring, pipet ukur, erlenmeyer tertutup (*Iwaki*), cawan petri, cawan porselin, *grinder*, chamber KLT, mikropipet (*Socorex*), pipet tetes, spatula, tabung reaksi (*Pyrex'Iwaki*), Spektrofotometri UV-Vis (*Genesys 10S*), neraca analitik (*Ohaus*), *ultrasonicbath* (*GT Sonic*), *waterbath* (*Memmert WNB10FC*), *Moisture Balance*, lampu UV, oven (*Memmert UN160*), vial dan rak tabung reaksi.

2. Bahan

Sampel daun kersen (*Muntingia calabura* L.), standar asam tanat, aquadest, metanol, etanol *p.a.*, etil asetat, reagen FeCl_3 1%, Na_2CO_3 35% , reagen *Folin Ciocalteu (p.a)* dan plat KLT F₂₅₄.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi

Tanaman kersen (*Muntingia calabura* L.) diperoleh dari area Kampus 2 Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta, kemudian dilakukan determinasi di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Ilmu Terapan, Universitas Ahmad Dahlan dengan melampirkan foto atau gambar dari tanaman kersen, seperti daun, batang, buah, biji, bunga, rimpang dan akar.

2. Penyiapan sampel

Daun kersen yang telah diambil dibersihkan dengan air mengalir, sampel disortasi untuk memisahkannya dari kotoran, dikering anginkan dan dilanjut dengan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40°C, tujuannya guna menurunkan kadar air pada sampel. Parameter kering adalah jika sampel diremas maka akan hancur. Sampel yang sudah kering, diserbuk dengan grinder kemudian diayak menggunakan ayakan 40 mesh, kemudian disimpan ke dalam wadah tertutup dan kedap udara (Sari, 2022).

3. Ekstraksi sampel

Ekstraksi menggunakan metode UAE dilakukan sebanyak 4 kali *running* dengan cara menimbang sampel sebanyak 50 g kemudian dilarutkan ke dalam 500 mL pelarut metanol (1:10) sampai semua sampel terendam seluruhnya. Ekstraksi menggunakan metode UAE dilakukan selama 10 menit dengan suhu 40°C dan disaring menggunakan kertas saring. Didapatkan hasil berupa filtrat, dipekatkan menggunakan *waterbath* pada suhu 40°C, hingga diperoleh ekstrak

kental (Sari, 2022). Selanjutnya dihitung rendemen ekstrak metanol daun kersen menggunakan persamaan (1):

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

4. Kontrol kualitas ekstrak

Ekstrak kental digunakan untuk pengujian, yaitu untuk uji organoleptik, uji kadar air dan perhitungan rendemen ekstrak.

a. Uji organoleptik

Uji organoleptik meliputi tekstur, aroma dan warna.

b. Kadar air

Dilakukan uji kadar dengan cara ditimbang sampel ekstrak metanol daun kersen sebanyak 2 g. Digunakan alat *Moisture Balance* untuk pengujian. Diatur pada suhu 105°C lalu dihidupkan, tunggu hingga alat berbunyi yang menandakan analisis telah selesai. Syarat kadar air yang baik adalah apabila suatu ekstrak simplisia tidak boleh mengandung lebih dari 10% (Pakiding, 2022).

5. Identifikasi senyawa tanin secara kualitatif

a. Uji tabung

Sebanyak 0,2 g ekstrak metanol daun kersen dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dicampur dengan air panas. Kemudian didihkan selama 5 menit dan disaring. Jika terbentuk warna hijau kehitaman atau biru kehitaman setelah menambahkan 1% FeCl₃ sebanyak 3 tetes, maka hasilnya dapat dianggap positif mengandung tanin (Ola *et al.*, 2020).

Standar asam tanat ditimbang sebanyak 100 mg dan ekstrak metanol daun kersen ditimbang sebanyak 100 mg, dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 2 mL aquadest dan FeCl₃ 1% sebanyak 2 tetes, hasil dapat dikatakan positif jika sampel berwarna biru kehitaman (Sari, 2022). Dilakukan uji tabung pada standar asam tanat ditujukan sebagai kontrol positif.

b. Uji KLT

1) Pembuatan fase gerak dan penjuanan bejana

Penentuan tanin digunakan fase gerak metanol:etil asetat (8:2) yang sebelumnya sudah dilakukan optimasi, dimasukkan kedalam chamber kemudian ditutup dengan rapat dan dilakukan penjuanan menggunakan kertas saring yang ditandai jika sudah terbasahi sampai ke atas chamber (Aryantini, 2021).

2) Pembuatan larutan ekstrak dan pembanding

Ekstrak metanol daun kersen dibuat konsentrasi 10.000 ppm, kemudian dibuat larutan standar asam tanat 10.000 ppm.

3) Uji KLT untuk identifikasi kandungan senyawa aktif

Digunakan plat KLT silika gel F₂₅₄ sebagai fase dengan ukuran 10 cm x 4 cm yang diberi tanda garis atas 1 cm dan bawah 1 cm. Setelah dilakukan penjuanan, dimasukkan plat kedalam chamber kemudian ditutup lalu amati hingga eluen naik pada batas atas. Diambil plat kemudian dikering anginkan selanjutnya diamati dibawah sinar UV 245 nm dan 365 nm (Yuda *et al.*, 2017).

6. Penentuan kadar total tanin ekstrak metanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) sesuai penelitian Wibisono (2023) yang sudah dimodifikasi

a. Pembuatan larutan Na₂CO₃ 35%

Ditimbang sebanyak 35 g Na₂CO₃ dan dimasukkan kedalam gelas beker dengan menambahkan 50 mL aquadest untuk melarutkan Na₂CO₃. Kemudian masukkan kedalam labu takar 100 mL dan larutkan dengan sonikator hingga tidak ada partikel. Kemudian ditambahkan dengan aquadest hingga 100 mL (Chandran & Indira, 2016).

b. Pembuatan larutan standar asam tanat

Ditimbang asam tanat sebanyak 10 mg, dilarutkan dalam aquadest menggunakan labu takar 10 mL sehingga diperoleh

konsentrasi 1000 ppm. Dibuat larutan stok seri kadar 40, 60, 80, 100 dan 120 ppm menggunakan aquadest dengan volume 5 mL (Pratama *et al.*, 2019).

c. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ maks)

Dimasukkan aquadest sebanyak 4 mL ke dalam tabung reaksi dengan larutan asam tanat 80 ppm merupakan konsentrasi tengah, diambil sebanyak 250 μ L pada tabung reaksi kemudian ditambah sebanyak 250 μ L reagen *Folin Ciocalteu* dan Na_2CO_3 35% sebanyak 500 μ L, lalu digojog hingga homogen. (Mukhriani *et al.*, 2014). Dibaca absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada rentang 400-800 nm pada interval 1 nm dan diperoleh hasil pada panjang gelombang maksimal yaitu 752 nm.

d. Penentuan *operating time*

Dimasukkan aquadest sebanyak 4 mL ke dalam tabung reaksi dan asam tanat 80 ppm diambil sebanyak 250 μ L pada tabung reaksi, ditambah reagen *Folin Ciocalteu* sebanyak 250 μ L dan sebanyak 500 μ L Na_2CO_3 35%, digojog agar homogen. Dibaca absorbansi dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah didapat yaitu 752 nm selama 1 jam dengan interval 1 menit (Ipandi *et al.*, 2016), diperoleh absorbansi yang stabil pada menit ke-34.

e. Pembuatan kurva baku standar asam tanat (1000 ppm)

Diambil tiap larutan seri kadar asam tanat sebanyak 250 μ L, diletakkan ke dalam tabung reaksi, reagen *Folin Ciocalteu* sebanyak 250 μ L, sebanyak 500 μ L Na_2CO_3 35% dan aquadest sebanyak 4 mL, digojog agar homogen dan didiamkan selama *operating time* yang didapat. Dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 752 nm. Kemudian dibuat kurva hubungan antara kadar asam tanat (ppm) vs absorbansi yang telah diperoleh.

f. Pembuatan larutan uji (1000 ppm)

Ditimbang ekstrak metanol daun kersen sebanyak 10 mg, dilarutkan dalam etanol *p.a* hingga mencapai volume 10 mL sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm.

g. Penentuan kadar tanin total

Dimasukkan kedalam tabung reaksi ekstrak metanol daun kersen sebanyak 250 μ L, ditambahkan sebanyak 250 μ L reagen *Folin Ciocalteu* dan 500 μ L larutan Na_2CO kemudian ditambah aquadest sebanyak 4 mL. Diinkubasi selama 34 menit pada suhu ruang kemudian dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh yaitu 752 nm. Penentuan kadar total tanin dilakukan sebanyak 3 kali (Pratama *et al.*, 2019).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Nilai absorbansi dari larutan standar asam tanat digunakan untuk memperoleh data dari kurva kalibrasi. Regresi linier dibuat dengan menggunakan data ini, setelah menyesuaikan data ke dalam persamaan regresi linier, $y = bx + a$, di mana (y) mewakili absorbansi dan (x) menunjukkan konsentrasi (ppm) atau kadar senyawa, besaran total senyawa dalam analisis data ditentukan. Persamaan regresi linier dihitung menggunakan perangkat lunak *Microsoft Excel*, menghasilkan persamaan linier standar untuk kurva absorbansi versus konsentrasi. Penentuan kadar total tanin dihitung menggunakan persamaan (2):

$$\text{TTC} = \frac{\text{C. V. Fp}}{\text{g}} \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan:

TTC : *Total Tannin Content* (mgTAE/g)

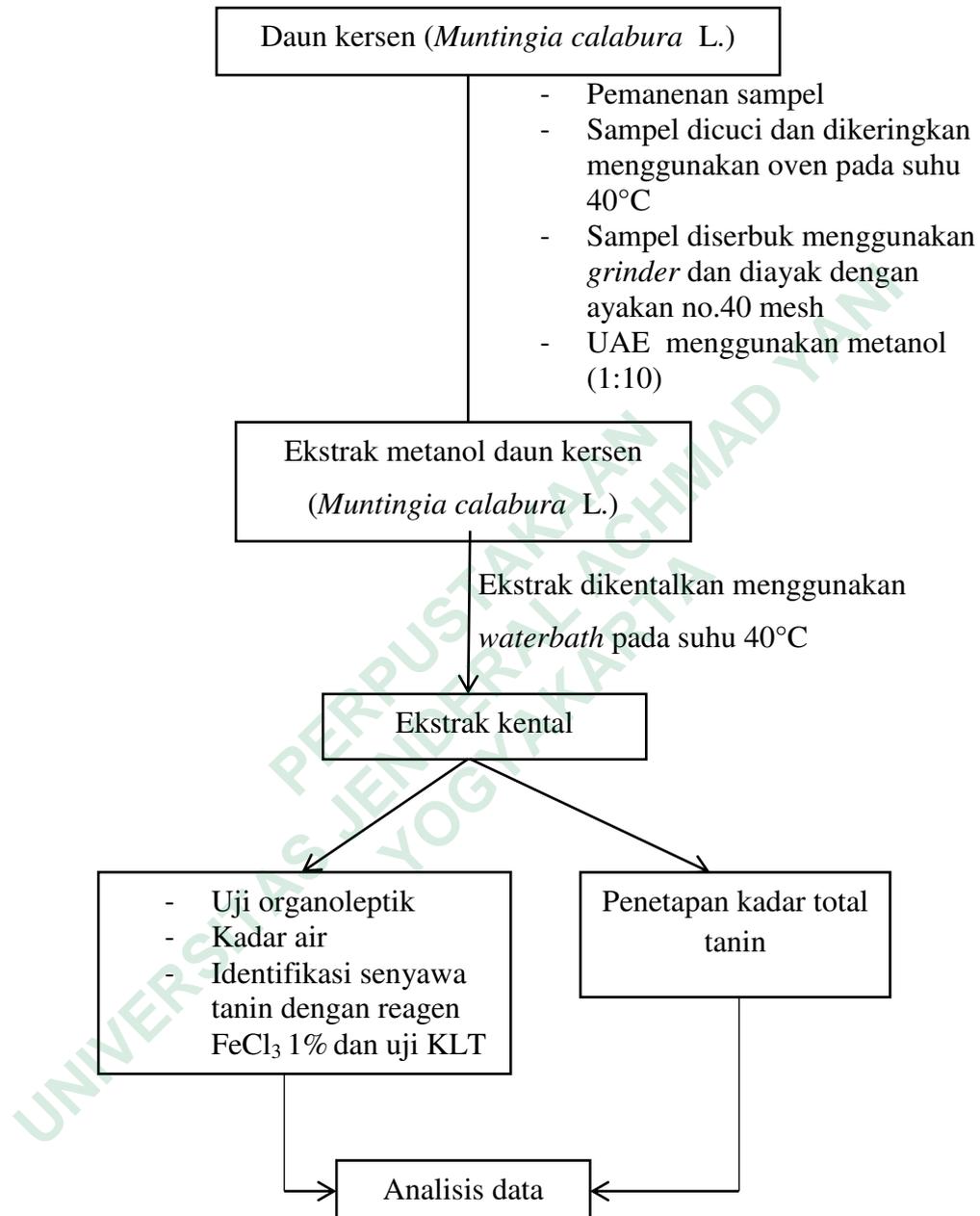
C : Konsentrasi tanin (x)

V : Volume analit yang digunakan (mL)

Fp : Faktor pengenceran

g : Berat sampel yang digunakan (g)

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
PERPUSTAKAAN
YOGYAKARTA

SKEMA PENELITIAN**Gambar 5. Skema Penelitian**