

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang tumbuh di daerah Sukoharjo, Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan adalah daun muda yang segar diambil dari tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) dengan spesifikasi daun yang muda berwarna merah menyala.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah kadar (% rendemen), kualitas flavonoid dan komponen penyusun dalam flavonoid dari tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) daun muda segar.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini diklasifikasikan dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel terikat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini merupakan variabel yang mempengaruhi variabel terikat, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti secara cepat. Variabel dalam penelitian ini adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian ini. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah umur daun pucuk

merah, sedangkan variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah cara penetapan kadar flavonoid tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.), metode pembuatan serbuk, metode pembuatan ekstrak. Variabel terikat dalam penelitian ini kadar flavonoid daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) secara spektrofotometri UV-Vis.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) adalah daun dari tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang tumbuh di daerah Sukoharjo, Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah.

Kedua, daun muda adalah daun tanaman pucuk merah yang berwarna merah dan sehat.

Ketiga, daun tua adalah daun tanaman pucuk merah yang berwarna hijau dan sehat.

Keempat, ekstrak daun pucuk merah adalah ekstrak daun pucuk merah yang diperoleh dengan metode remaserasi menurut Farmakope Herbal Indonesia dengan pelarut etanol 96%.

Ketiga, spektrofotometri UV-Vis adalah metode penetapan kadar flavonoid setelah sampel direaksikan dengan $AlCl_3$.

C. Teknik Sampling

Sampel yang digunakan pada penelitian ini diambil secara acak dari tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang terdapat di daerah Sukoharjo, Kabupaten Sukoharjo Jawa Tengah.

D. Bahan dan alat

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) daun muda yang diambil dari daerah Sukoharjo, Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah.

1.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah aquades, etanol 96%, *n*-butanol, asam asetat, $AlCl_3$, CH_3COONa .

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat maserasi, vial, cawan porselin, tabung reaksi, beaker glass, pipet tetes, gelas ukur, pipa kapiler, pipet volume, kertas saring, chamber, lempeng kromatografi, tisu, timbangan, karet gelang, plastik, oven dan spektrofotometri UV-Vis.

E. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian adalah meyakinkan kebenaran sampel daun tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis serta mencocokkan ciri morfologis yang ada pada tanaman. Dilakukannya determinasi di laboratorium program studi biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengumpulan bahan

Tanaman pucuk merah yang digunakan dalam penelitian berasal dari daerah Sukoharjo Solo Baru, Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah yang diambil dalam

keadaan segar secara acak. Daun kemudian dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang melekat. Selanjutnya, dilakukan perajangan.

3. Pembuatan serbuk simplisia

Daun yang sudah dilakukan perajangan, kemudian dioven sampai daun kering dengan suhu 50°C supaya kadar yang terkandung pada daun tidak hilang, setelah kering dilakukan penggilingan dan pengayakan dengan pengayakan nomer 40. Serbuk simplisia yang tertinggal pada ayakan digiling kembali sampai bisa lolos melewati ayakan.

4. Penetapan bobot susut pengeringan

Ditimbang krus kosong, kemudian sampel 1 g dimasukkan ke dalam krus. Dioven pada suhu 100°C, lalu ditimbang sampai bobot konstan.

5. Pembuatan ekstrak daun muda dan tua pucuk merah

Sebanyak 300 g serbuk simplisia daun pucuk merah direndam dalam 3000 mL etanol 96% dengan metode maserasi selama 24 jam. Hasil rendaman, disaring. Selanjutnya, ampas penyaringan diremaserasi kembali dengan 1500 mL etanol 96% selama 24 jam dan disaring lagi menggunakan kertas saring. Kemudian seluruh filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dan oven hingga didapatkan ekstrak kental.

6. Ekstraksi flavonoid

6.1. Larutan uji untuk simplisia. Timbang seksama lebih kurang 1 g serbuk simplisia, masukkan kedalam labu Erlenmeyer, tambah 10 mL *etanol P*, ekstraksi selama 1 jam dengan pengadukan magnetik. Saring ke dalam labu tentukur 10 mL, tambahkan *etanol P* melalui penyaring sampai tanda.

6.2. Larutan uji untuk ekstrak. Timbang seksama lebih kurang 0,2 g ekstrak, masukkan ke dalam labu erlenmeyer, tambahkan 10 mL *etanol* P, aduk selama 30 menit dengan pengaduk magnetik. Saring kedalam labu tentukur 10 mL, tambahkan *etanol* P sampai tanda.

5. Identifikasi flavonoid secara Kromatografi Lapis Tipis

Flavonoid ditotolkan pada lempeng KLT dengan menggunakan pipa kapiler. Lempeng tersebut tersebut dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah dijenuhkan. Fase gerak yang digunakan adalah *n*-butanol : asam asetat : air (BAA) dengan perbandingan (4:1:5). Setelah fase gerak naik sampai tanda batas atas, lempeng dikeluarkan dari *chamber* dan diangin-anginkan. Warna yang timbul diamati, kemudian dihitung harga R_f bercak dengan rumus :

$$R_f = \frac{\text{jarak bercak}}{\text{jarak yang ditempuh oleh fase gerak}} \times 100$$

6. Penetapan kadar flavonoid total secara Spektrofotometri UV-Vis

1.1. Penentuan panjang gelombang maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin dilakukan dengan *running* larutan kuersetin pada *range* panjang gelombang 400-450 nm. Hasil *running* menunjukkan panjang gelombang maksimum standar baku kuersetin berada ada panjang gelombang 424 nm. Panjang gelombang maksimum tersebut yang digunakan untuk mengukur serapan dari sampel simplisia dan ekstrak daun pucuk merah.

1.2. Penentuan *operating time*. Penentuan *operating time* ditentukan dengan membaca serapan larutan kuersetin pada konsentrasi 100 ppm pada panjang gelombang 424 nm setelah direaksikan dengan $AlCl_3$ tiap 1 menit selama 1 jam.

Absorbansi yang stabil menandakan bahwa pada waktu tersebut terjadi reaksi stabil antara kuersetin dengan pereaksi AlCl_3 . Waktu pengukuran dihitung sejak dicampurnya larutan kuersetin dengan pereaksi AlCl_3 . Absorbansi stabil dari larutan kuersetin dengan pereaksi AlCl_3 pada penelitian ini terjadi pada menit ke-25 sampai menit ke-34.

1.3. Pembuatan Larutan Baku. Serbuk kuersetin ditimbang, dimasukkan dalam *beaker glass*, dilarutkan dengan aquadest, dimasukkan labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquadest sampai tanda batas.

1.4. Pembuatan kurva baku. Larutan kurva baku kuersetin 50 ppm; 60 ppm; 70 ppm; 80 ppm; 90 ppm; 100 ppm dibuat dengan cara memipet 0,5 mL, 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL, 0,9 mL, 1 mL dari larutan baku kuersetin 1000 ppm kedalam labu ukur 10 mL kemudian diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas.

1.5. Akurasi. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Uji akurasi dilihat dari bahan kontrol dan dihitung sebagai persen *recovery* (% R), sehingga diperoleh metode yang akurat.

1.6. Presisi. Presisi dari metode uji ditentukan dengan rumus :

$$\text{RSD} = \frac{SD}{x} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_1 - \bar{x})^2}{n-1}} \dots\dots\dots(2)$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_1}{n} \dots\dots\dots(3)$$

keterangan :
 SD = Standar Deviasi
 \bar{x} = Nilai rata-rata
 n = Ulangan

RSD = *Relative Standart Deviation*

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV) 2% atau kurang. Kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa jumlah sampel dan kondisi laboratorium (Riyanto, 2014).

1.7. LOD dan LOQ. LOD atau *Limit of Detection* adalah parameter untuk penentuan kadar sampel dengan kadar yang terkecil akan tetapi masih memberikan tanggap detektor yang berbeda dengan pembanding. LOQ atau *Limit of Quantitation* adalah kadar terkecil dari suatu sampel yang dapat dianalisis. LOD dan LOQ dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{SD}}{\text{Slope}} \dots\dots\dots(4)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{\text{Slope}} \dots\dots\dots(5)$$

1.8. Preparasi sampel. Sampel simplisia dan ekstrak masing-masing ditimbang dan dimasukkan dalam *beaker glas*, ditambahkan dengan etanol *p.a*, kemudian diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 menit. Selanjutnya disaring dengan kertas saring ke dalam labu takar.

1.9. Penetapan kadar flavonoid total daun pucuk merah muda dan tua. Penentuan kandungan flavonoid total merujuk pada prosedur Chang *et al* (2002) dengan beberapa konsentrasi menggunakan kuersetin sebagai standar. Dari larutan stok dipipet sebanyak 1 mL dan dicukupkan volumenya sampai 10 mL dengan etanol 96%. Kemudian dipipet 1 mL dan ditambahkan 3 mL etanol 96%,

0,2 mL AlCl_3 ; 0,2 mL kalium asetat 1 M, dan 5,6 mL aquabidestillata. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV Visibel dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Larutan sampel dibuat dalam tiga kali replikasi.

F. Analisis Statistik

Uji statistik dengan metode ANOVA One-way berdasarkan daun tua dan daun muda pada simplisia dan ekstrak daun pucuk merah. Nilai sig pada One sampel kolmogorov-smirnov Test $0,321 > 0,05$, sehingga data tersebut diterima dan terdistribusi normal, sehingga dapat dilakukan analisis variansi (ANOVA). Pada uji ANOVA One-way nilai probabilitas Levene statistic (sig) adalah $0,019 < 0,05$ maka data tersebut mempunyai variansi yang tidak sama dan tidak homogenitas. Berdasarkan uji Anova One-way diperoleh nilai sig $0,000 < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa dari hasil analisis ada perbedaan antara kelompok tua dan muda. Dari hasil analisis ANOVA One-way dapat diperkuat dengan uji Multiple Comparisons.