

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

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

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah kadar fenolik total dari daun muda dan daun tua tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.).

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 kualitasnya 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 daun pucuk merah muda dan tua, sedangkan variable terkontrol dalam penelitian ini adalah metode isolasi fenolik total tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.). Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar fenolik total daun pucuk merah muda dan tua (*Syzygium myrtifolium* Walp.) secara Spektrofotometri Uv-Vis.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) adalah daun muda yang berwarna jingga kemerahan dan daun tua yang berwarna hijau dari tanaman pucuk merah yang tumbuh di daerah Karanganyar, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, kadar fenolik total adalah kadar fenolik total yang dinyatakan sebagai asam galat dengan metode Folin-ciocalteu menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Ketiga, spektrofotometri UV-Vis adalah salah satu metode pengukuran kadar fenolik total berdasarkan gugus kromofor daun pucuk merah muda yang berwarna merah menyala dan daun tua yang berwarna hijau.

C. Teknik Sampling

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

D. Bahan dan Alat

1. Bahan

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

1.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah aquades, etanol 96%, pembanding asam galat, natrium hidroksida 1%, dan reagen Folin-ciocalteu, metanol pro analisis.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat maserasi, *rotary evaporator*, oven, vial, tabung reaksi, *beaker glass*, pipet tetes, gelas ukur, pipa kapiler, pipet volume, kertas saring, timbangan, gunting, karet gelang, plastik, erlenmeyer, corong, dan spektrofotometri UV-Vis.

E. Alur Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman pucuk merah dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Negeri Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengumpulan bahan

Tanaman pucuk merah yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari daerah Karanganyar, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah yang diambil dalam keadaan segar secara acak pada pagi hari.

3. Preparasi simplisia

Sejumlah daun pucuk merah dicuci bersih dengan air mengalir. Selanjutnya daun dikeringkan dalam oven pada suhu 50⁰ C hingga kering yang ditandai dengan daun mudah untuk dihancurkan. Simplisia yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan mesin penyerbuk lalu diayak dengan ayakan nomor mesh 60.

4. Ekstraksi

Pembuatan ekstrak dilakukan berdasarkan metode Kemenkes RI (2013). Sebanyak 300 g serbuk simplisia daun pucuk merah direndam dalam 3000 mL etanol 96% dalam botol coklat dengan metode maserasi selama 24 jam. Filtrat diperoleh melalui penyaringan menggunakan kertas saring. Selanjutnya, ampas penyaringan diremaserasi kembali dengan 1500 mL etanol 96% selama 24 jam dan disaring lagi menggunakan kertas saring. Kemudian filtrat yang diperoleh dari hasil remaserasi dicampur dengan filtrat sebelumnya lalu diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dan *waterbath* sehingga didapatkan ekstrak etanol kental daun pucuk merah. Ekstrak kemudian ditutup dengan aluminium foil untuk digunakan pada analisis selanjutnya.

5. Karakterisasi simplisia dan ekstrak

Karakterisasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah pengujian susut pengeringan. Susut pengeringan dilakukan dengan memasukkan sampel sebanyak 3 gram pada instrumentasi *moisture balance*. Pengukuran susut pengeringan pada suhu 105°C, kemudian ditunggu hingga alat mengeluarkan bunyi tanda tercapainya bobot konstan.

6. Skrining fitokimia

6.1 Pengujian alkaloid. Sampel simplisia dan ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh dipakai untuk tes alkaloid. Diambil 3 tabung reaksi, lalu ke dalamnya dimasukkan 0,5 ml filtrat. Pada masing-masing tabung reaksi ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat, dan ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff. Alkaloid positif jika terjadi endapan atau kekeruhan pada dua dari tiga percobaan di atas (Farnsworth, 1966).

6.2 Pengujian flavonoid. Sebanyak 2 g simplisia dan ekstrak ditimbang, ditambah 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring dalam keadaan panas. Diambil 5 ml filtrat kemudian dimasukkan serbuk magnesium secukupnya, 2 ml amil alkohol dan 1 ml HCl pekat. Dikocok kuat-kuat dan dibiarkan memisah. Hasil positif apabila flavonoid ditunjukkan dengan timbul warnag merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Farnsworth, 1966).

6.3 Pengujian saponin. Sampel simplisia dan ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 g dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan, dikocok kuat-kuat selama 10 menit. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2N menunjukkan adanya saponin (Farnsworth, 1966).

6.4 Pengujian tanin dan fenolik. Sampel ditimbang sebanyak 1 g, dididihkan selama 3 menit dalam air suling lalu didinginkan dan disaring. Pada filtrat ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1% b/v. Jika terjadi warna

biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin dan fenolik (Farnsworth, 1966).

7. Optimasi metode

7.1 Penentuan panjang gelombang maksimum (λ maks). Sebanyak 1,5 mL larutan stok asam galat ditambah dengan 5 mL reagen Folin-ciocalteu yang telah diencerkan dengan akuades (1:10 v/v). Ditambahkan 4,0 mL larutan natrium hidroksida 1% dan didiamkan selama OT. Kemudian dilakukan scanning panjang gelombang serapan maksimum pada panjang gelombang 600-800 nm.

7.2 Penentuan *Operating Time* (OT). Sebanyak 1,5 mL larutan asam galat ditambah dengan 5 mL reagen Folin-ciocalteu yang telah diencerkan dengan akuades (1:10 v/v). Ditambahkan 4,0 mL larutan natrium hidroksida 1 % dan dibaca serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 768 nm selama 90 menit.

8. Pembuatan larutan pembanding dan uji

8.1 Pembuatan larutan NaOH 1%. Sebanyak 1 gram NaOH *p.a* dilarutkan dalam 100 ml aquadest.

8.2 Pembuatan larutan pembanding. Larutan asam galat dibuat dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ metanol *p.a*. Larutan tersebut diambil sebanyak 4, 5, 6, 7, dan 8 mL kemudian ditambah dengan metanol *p.a* hingga 10 mL dan diperoleh konsentrasi larutan baku asam galat sebesar 40, 50, 60, 70, dan 80 $\mu\text{g/mL}$.

8.3 Pembuatan larutan sampel simplisia. Sebanyak 1 gram serbuk simplisia, dimasukkan dalam erlenmeyer, kemudian ditambah 25 ml metanol *p.a*. Ekstraksi dengan pengaduk magnetik selama 1 jam, kemudian disaring dalam labu

ukur 25 ml. Metanol *p.a* ditambahkan hingga tanda. Diambil 100 µl larutan uji, lalu ditambah metanol *p.a* hingga 10 ml.

8.4. Pembuatan larutan sampel ekstrak. Sebanyak 0,2 gram ekstrak etanol ditimbang dimasukkan dalam erlenmeyer, kemudian ditambah 25 ml metanol *p.a*. Ekstraksi dengan pengaduk magnetik selama 1 jam, kemudian disaring dalam labu ukur 25 ml. Metanol *p.a* ditambahkan hingga tanda. Diambil 142 µl larutan uji, lalu ditambah metanol *p.a* hingga 10 ml.

9. Pembuatan kurva baku

Masing-masing seri konsentrasi larutan pembanding sebanyak 1 ml larutan pembanding ditambahkan 5 ml enceran Folin-ciocalteu LP (7,5% dalam air). Diinkubasi selama 8 menit, ditambahkan Natrium hidroksida 1% lalu diinkubasi kembali selama 73 menit kemudian larutan diukur pada panjang gelombang 768 nm. Kurva baku yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi larutan asam galat dan absorbansi dibuat dalam persamaan regresi linier :

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y = absorbansi

a = *intercept*

b = *slope*

x = konsentrasi larutan baku asam galat (µg/ml)

10. Validasi metode

10.1 Linearitas. Linieritas ditentukan berdasarkan nilai r pada persamaan regresi linier kurva baku. Menurut Miller dkk., (2005), batas penerimaan nilai r atau dapat dikatakan bahwa kurva baku tersebut telah linier adalah sebesar 0,99.

10.2 Akurasi. Akurasi dinyatakan dengan nilai persen *recovery* analit dengan membuat larutan baku dengan tiga konsentrasi berbeda. Menurut Harmita (2004), metode yang baik adalah metode yang memiliki nilai *recovery* antara 98% - 102%.

10.3 Presisi. Penentuan presisi dilakukan dengan menghitung nilai koefisien variasi. Koefisien variasi dihitung dengan cara membagi nilai simpangan baku dengan nilai rata – rata konsentrasi. Suatu metode dikatakan baik apabila koefisien variasinya kurang dari 2% (Harmita, 2004).

10.4 LOD dan LOQ. LOD merupakan batas konsentrasi analit dalam sampel yang masih memberikan respon signifikan, sedangkan LOQ adalah konsentrasi terendah analit yang masih memberikan hasil yang linier (Harmita, 2004). LOD dan LOQ dinyatakan dalam rumus :

$$\text{LOD} = \frac{\text{SD} \times 3,3}{\text{Slope}}$$

$$\text{LOQ} = \frac{\text{SD} \times 10}{\text{Slope}}$$

11. Pengukuran sampel

Sebanyak 1 ml larutan uji dan larutan pembanding ditambahkan 5 ml enceran Folin-ciocalteu LP (7,5% dalam air). Diinkubasi selama 8 menit, ditambahkan NaOH 1% lalu diinkubasi kembali selama 73 menit. Larutan diukur dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 768 nm.

F. Analisis Hasil

Kandungan fenolik total dinyatakan dalam % sebagai asam galat (Kemenkes RI, 2013). Nilai absorbansi larutan uji dimasukkan ke dalam persamaan kurva baku asam galat, sehingga diperoleh nilai ekivalensi larutan uji terhadap asam galat. Kadar fenolik total diperoleh berdasarkan rumus :

$$\text{Kadar fenolik total} = \frac{x}{w} \times V \times F \times 100\%$$

x = kadar yang diperoleh dari kurva baku (g / ml)

W = bobot sampel (g)

V = volume pembuatan (ml)

F = faktor pengenceran

Kadar fenolik total simplisia dan ekstrak yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan uji statistik *independent sample t-test* untuk melihat ada tidaknya perbedaan kadar fenolik total yang signifikan antara daun muda dan tua.