

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers) yang didapatkan dari Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Kranganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah daun dari tanaman cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers) yang berwarna hijau segar, diambil sesuai dengan kebutuhan sehingga memenuhi syarat untuk dilakukan penelitian. Sampel didapatkan dari Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Kranganyar, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel Bebas

Variabel bebas atau independen merupakan variabel yang dapat mempengaruhi atau menjadi sebab perubahan atau timbulnya variabel terikat. Variabel bebas atau independen dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers).

2. Variabel Terkait

Variabel terikat atau dependen merupakan variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat karena terdapat variabel bebas. Variabel terikat atau dependen dalam penelitian ini adalah nilai absorbansi dan kadar flavonoid total ekstrak etanol 70% dan 96% dari metode ekstraksi maserasi dan sokletasi daun cocor bebek dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

3. Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini meliputi kondisi peneliti, kondisi alat, dan kondisi pelarut.

4. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, Daun cocor bebek yang diambil dari Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Kranganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun cocor bebek dibuat dengan menggunakan daun yang tidak terlalu muda dan tua, masih segar berwarna hijau yang diproses dengan tahapan pencucian, pengeringan, penggilingan,

pengayakan dengan mesh No.60.

Ketiga, ekstrak daun cocor bebek adalah ekstrak yang diproses dengan metode maserasi dan sokletasi. Maserasi dan sokletasi dilakukan dengan tujuan mendapatkan ekstrak cocor bebek (*Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers*).

Keempat, Pengujian kualitatif yang dilakukan dengan menggunakan metode uji tabung. Pengujian kuantitatif digunakan untuk menetapkan adanya senyawa flavonoid yang terkandung dalam empat ekstrak daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers*) yang memiliki perlakuan yang berbeda.

Kelima. Metode kuantitatif adalah analisis yang dilakukan untuk menentukan kadar flavonoid total daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers*) dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mikropipet, pipet tetes, sendok tanduk, sarung tangan, pisau cukur, gunting, kapas, kurs, cawan penguap, penjepit, korok, serbet, kaca arloji, labu tenukur, corong, botol plastik, oven, batang pengaduk, blander, kuvet, gelas kimia, seperangkat alat maserasi, timbangan digital, termometer, spektrometri UV-Vis, pH meter, *ratory evaporator*, inkubator, alat tulis, kamera.

2. Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini meliputi ekstrak etanol daun cocor bebek, etanol 70%, etanol 96%, etanol pa, serbuk quersetin, etil asetat, serbuk magnesium, aquadest, AlCl₃ 10%.

D. Jalannya Penelitian

1. Persiapan Dan Pengolahan Sampel Daun Cocor Bebek (*Kalanchoe Pinnata (Lam.) Pers*)

1.1. Determinasi Tanaman Daun Cocor Bebek Determinasi tanaman cocor bebek dilalukan di Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional. Tujuan dilakukannya determinasi adalah untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan penelitian yaitu *Kalanchoe Pinnata (Lam.) Pers*.

1.2. Pengambilan Sampel. Sampel yang digunakan diambil dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Pemanenan daun cocor bebek dilakukan ada umur tiga bulan (sebelum tanaman berbunga). Dalam penelitian pengujian antiinflamasi antara daun cocor bebek yang dipanen sebelum berbunga dan setelah berbunga bahwa daun cocor bebek yang dipanen sebelum berbunga menunjukkan aktivitas antiinflamasi sedangkan daun cocor bebek setelah berbunga tidak menunjukkan aktivitas antiinflamasi.

1.3. Sortasi Basah. Simplisia yang sudah dikumpulkan dan dicuci dengan air mengalir (sortasi basah) dengan tujuan agar mengurangi kandungan air pada simplisia hingga batas tertentu sehingga baik digunakan untuk penelitian lebih lanjut.

1.4. Pengeringan. Pengeringan merupakan suatu cara untuk menghilangkan sebagian besar air dari simplisia dengan media pengeringan menggunakan energi panas matahari. Pemanasan diperlukan untuk mengeluarkan air dengan tujuan agar mempermudah penanganan dari bahan-bahan untuk proses pengujian selanjutnya.

Daun cocor bebek yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan dengan diangin-anginkan kemudian dirajang memanjang 0,5 cm dan dikeringkan menggunakan sinar matahari sampai kering, kemudian simplisia disortasi kering. Parameter kering yaitu daun mudah dipatahkan atau hancur bila diremas.

1.5. Penyerbukan. Simplisia yang sudah dikeringkan dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan blander. Serbuk lalu diayak dengan ayakan No.60 dan hasil serbuk yang sudah diayak kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat (Anam, 2015). Hasil serbuk yang didapatkan dimasukkan ke dalam wadah plastik. Pembuatan serbuk dilakukan di laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

1.6. Ekstraksi. Pengolahan ekstrak dilakukan secara maserasi dan sokletasi dengan menimbang 50 gram serbuk simplisia daun cocor bebek. Cara maserasi dengan dilakukan proses penyarian dua tahap. Tahap pertama, ditambahkan pelarut etanol 70% dan etanol 96% sebanyak 500 mL lalu simplisia direndam sekurangnya 6 jam diseringkan untuk pengadukan sesering mungkin dan dilakukan pendiaman selama 18 jam. Hasil maserasi dipisahkan lalu diulangi sebanyak 2 kali dengan jenis dan jumlah volume sebanyak setengah kali jumlah volume penyarian pertama. Hasil maserasi ini harus terhindar dari paparan cahaya matahari langsung yang mengenai bejana

maserasi. Endapan maupun filtrat ekstrak dipisah, filtrat pertama dan filtrat kedua dicampur kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan diuapkan di atas waterbath hingga ekstrak kental (Devi *et al.*, 2017).

Cara sokletasi dilakukan dengan cara menimbang sampel sesuai kisaran berat yaitu 50 gram yang diperlukan lalu dibungkus dalam kertas saring dimasukkan dalam thimbel. Kemudian, pelarut dimasukkan kedalam labu dengan variasi volume, dan pemanasan pada suhu 65°C dengan variabel waktu ekstraksi. Kemudian, dilakukan pemisahan minyak dari sovennya dengan evaporator pada suhu 69°C. Keringkan minyak dengan oven pada suhu 110°C selama 1 jam, lalu timbang berat dan lakukan analisis lanjutan.

2. Uji Kualitatif

2.1 Pemeriksaan Fisik Serbuk Daun Cocor Bebek.

2.1.1 Penetapan Susut Pengerinan. Penetapan susut pengerinan dilakukan dengan cara menggunakan alat *moisture balance*, dengan mengkalibrasi alat terlebih dahulu, kemudian menara alat dengan akurasi sesuai dengan jumlah serbuk yang diujikan. Kemudian menimbang serbuk sebanyak 2 gram dimasukan ke dalam plat, dan catat hasil pengukuran dilihat dari angka dalam persen (%) pada alat. Penetapan susut pengerinan dilakukan sebanyak tiga kali replikasi dan mencari rata-rata dari hasil replikasi hasil tersebut. Hasil penetapan susut pengerinan yang baik yaitu tidak lebih dari 10% (Depkes RI, 2017).

2.1.2 Kadar Air Serbuk. Kadar air dilakukan untuk mengetahui kadar air dalam serbuk daun cocor bebek setelah mengalami beberapa proses pembuatan simplisia. Proses pembuatan simplisia salah satunya mengalami pengeringan, proses pengeringan yang dilakukan pada pembuatan simplisia ini dapat mengurangi kadar air dalam simplisia itu sendiri. Kadar air dapat mempengaruhi kualitas simplisia karena kemungkinan besar mudah mengalami kontaminasi mikroba serta dalam bentuk simplisia akan mudah berubah hingga rusak (Zulfatunna'im *et al.*, 2022)

2.2 Pemeriksaan Serbuk Dan Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek.

2.2.1 Pemeriksaan Organoleptis. Pemeriksaan organoleptis dilakukan untuk mengetahui sifat fisik dari serbuk dan ekstrak daun

cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers) yang meliputi bentuk, warna dan bau.

2.2.2 Identifikasi Kualitatif Dengan Metode Warna (Uji Tabung). Identifikasi kandungan kimia adalah salah satu cara untuk mendapatkan hasil kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam ekstrak daun cocor bebek. Identifikasi kandungan senyawa daun cocor bebek yaitu senyawa flavonoid, tannin, fenol, dan steroid. Identifikasi dilakukan di laboratorium Universitas Setia Budi.

2.2.2.a Identifikasi Kandungan Flavonoid. Identifikasi flavonoid dengan menimbang sebanyak 0,5 gram simplisia dilarutkan dengan 10 mL air panas dididihkan selama 5 menit. Kemudian menyaring larutan ekstrak, dan diperoleh filtrat A. Diambil sebanyak 5 mL filtrat A dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,1 gram kemudian ditambahkan HCl pekat sebanyak 1 mL dan ditambahkan amil alkohol sebanyak 1 mL kemudian dihomogenkan secara kuat serta dilakukan pendiaman selama beberapa saat hingga larutan memisah. Hasil positif (+) ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol. Jika tidak menunjukkan warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol, maka sampel dinyatakan negative (-) tidak adanya flavonoid (Depkes RI, 1987).

2.2.2.b Identifikasi Fenol. Serbuk dan ekstrak daun cocor bebek sebanyak 1 gram dipanaskan dalam 100 mL air suling dan dididihkan selama 15 menit kemudian disaring dan diperoleh filtrat. Filtrat sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan besi (III) klorida. Dikatakan positif fenolik apabila terbentuknya warna hijau, violet, biru sampai hitam (Depkes RI, 1979).

2.2.2.c Identifikasi Saponin. Serbuk dan ekstrak daun cocor bebek ditimbang sebanyak 0,05 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi setelah itu ditambah 10 mL air panas kemudian gojok kuat selama 10 detik. Saponin menunjukkan hasil positif apabila terbentuk buih setinggi 1 sampai 10 cm dan dengan penambahan 1 tetes asam klorida klorida 2 N, buih tidak hilang (Depkes RI, 1979).

2.2.2.d Identifikasi Tannin. Identifikasi ini menggunakan serbuk dan ekstrak daun cocor bebek ditimbang sebanyak 0,05 gram ditambah air sebanyak 10 mL air panas. Dan dilakukan penambahan 1 tetes larutan FeCl_3 . Tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman (Depkes RI, 1979).

2.2.2.e Identifikasi Steroid. Identifikasi ini dilakukan dengan penimbangan serbuk dan ekstrak daun cocor bebek sebanyak 0,1 gram dimasukkan cawan penguap ditambah 5 mL etanol 70% setelah dipanaskan dalam penangas air selama 2 menit. Dilakukan penyaringan dalam keadaan panas-panas kemudian filtrat diuapkan dalam penangas air hingga kering. Filtrat kering ditambah dengan CHCl_3 hingga larut dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan air hingga membentuk 2 lapisan CHCl_3 dan air. Lapisan CHCl_3 diambil kemudian dikeringkan dalam plat tetes, ditambah pereaksi Liebermann-Burchard (3 tetes asam asetat anhidrat dan ditambahkan 2-3 tetes H_2SO_4 pekat). Hasil steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau hijau, sedangkan terpen positif apabila terbentuk warna merah atau ungu (Depkes RI, 1979)

3. Uji Kuantitatif (Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak)

3.1. Preparasi Larutan Baku Kuersetin. Ditimbang 12,5 mg serbuk kuersetin, setelah itu dilarutkan menggunakan etanol p.a menggunakan gelas beker. dilarutkan pada labu ukur 100 mL hingga tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 125 ppm.

3.2. Penentuan panjang gelombang. Dengan cara pipet dari larutan baku dengan dipipet sebanyak 2 mL dalam labu tentukur 5 mL, dari larutan larutan standar dipipet 0,5 mL dengan mereaksikan kedalam labu tentukur 5 mL dengan penambahan 1,5 etanol p.a, 0,1 mL *Aluminium klorida* 10%, 0,1 mL *natrium asetat*, dan 2,8 mL air. Diukur serapannya panjang gelombang 400-800 nm (Depkes RI, 2017).

3.3. Operating time kuersetin. *Operating time* dilakukan dengan dipipet sebanyak 2 mL dalam labu tentukur 5 mL, dari larutan larutan standar dipipet 0,5 mL dengan mereaksikan kedalam labu tentukur 5 mL direaksikan dengan penambahan 1,5 etanol p.a, 0,1 mL *Aluminium klorida* 10%, 0,1 mL *natrium asetat*, dan 2,8 mL air. Kemudian homogenkan sampai larut lalu diamkan selama 30 menit. Ukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh selama 60 menit yang diukur tiap 1 menit (Depkes RI, 2017).

3.4. Penetapan Kurva Baku. Larutan baku dibuat variasi konsentrasi dengan 6 variasi konsentrasi yaitu 100 ppm, 87,5 ppm, 75 ppm, 62,5 ppm, 50 ppm, dan 37,5 ppm. Pipet masing-masing 4 mL, 3,5 mL, 3 mL, 2,5 mL, 2 mL, dan 1,5 mL dari larutan standar masukan dalam 5 mL labu tentukur dengan etanol p.a hingga tanda batas dipipet, selanjutnya 0,5 mL ditambah dengan dimasukan kedalam labu tentukur

5 mL direaksikan dengan 1,5 etanol p.a, 0,1 mL *Alumunium klorida* 10%, 0,1 mL *natrium asetat*, dan 2,8 mL air (Depkes RI, 2017).

3.5. Penetapan Kadar Flavonoid. Penetapan kadar flavonoid total dari keempat ekstrak dengan menimbang ekstrak sebanyak 15 mg ekstrak dengan melarutkan sedikit demi sedikit dalam cawan atau dengan kaca arloji hingga larut, selanjutnya dilarutkan dalam 10 mL labu tentukur dengan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan ekstrak kemudian dipipet 0,5 mL dimasukkan kedalam labu tentukur 5 mL direaksikan dengan 1,5 etanol p.a, 0,1 mL *Alumunium klorida* 10%, 0,1 mL *natrium asetat*, dan 2,8 mL air. Kemudian serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan panjang gelombang yang diperoleh saat mencapai *operating time* dimulai dari kadar terkecil. Selanjutnya, hitung persamaan regresi linier yang merupakan hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi, serta menentukan koefisien korelasinya. Kemudian dibuat kurva hubungan antara konsentrasi dan absorbansi (Depkes RI, 2017).

4. Verifikasi Metode

4.1. Linearitas. Uji linieritas dilakukan dengan menghitung secara statistik melalui koefisien korelasi (r) dari konsentrasi dan absorbansi larutan baku. Nilai r yang mendekati 1 menandakan hubungan linear antara konsentrasi analit dengan absorbansi yang terukur. Variasi konsentrasi dibuat 6 variasi konsentrasi yaitu 100 ppm, 87,5 ppm, 75 ppm, 62,5 ppm, 50 ppm, dan 37,5 ppm. Larutan dilarutkan dalam labu tentukur 5 mL. Pipet masing-masing 4 mL, 3,5 mL, 3 mL, 2,5 mL, 2 mL, dan 1,5 mL dari larutan standar dilarutkan dalam 5 mL labu tentukur dengan etanol p.a hingga tanda batas dipipet, selanjutnya 0,5 mL ditambah dengan dimasukkan kedalam labu tentukur 5 mL direaksikan dengan 1,5 etanol p.a, 0,1 mL *Alumunium klorida* 10%, 0,1 mL *natrium asetat*, dan 2,8 mL air (Depkes RI, 2017).

4.2. Batas Deteksi (*Limit Of Detection, LOD*). Batas deteksi dihitung dengan persamaan regresi linier dari kurva baku. Perhitungan dapat dilakukan dengan cara memasukan absorbansi larutan baku hasil pengukuran ke dalam persamaan regresi linier yang diperoleh (Irnawati *et al.*, 2016).

4.3. Batas Kuantifikasi (*Limit Of Quantification, LOQ*). Batas kuantifikasi dihitung secara statistik dengan persamaan regresi linier dari kurva baku larutan induk. Perhitungan dapat dilakukan dengan cara memasukan absorbansi larutan baku hasil pengukuran ke dalam persamaan regresi linier yang diperoleh (Irnawati *et al.*, 2016).

4.4. Presisi. Uji presisi dilakukan dengan mengukur serapan 125 ppm. Dilakukan dengan cara dipipet larutan baku kuersetin 125 ppm. Dilakukan dengan cara dipipet larutan baku sebanyak 1,5 mL dimasukan dalam labu tentukur 5 mL kemudian ditambahkan dengan etanol p.a sampai tanda batas lalu dikocok hingga homogen dan pipet 0,5 mL dimasukan kedalam labu tentukur 5 mL direaksikan dengan 1,5 etanol p.a, 0,1 mL *Alumunium klorida* 10%, 0,1 mL *natrium asetat*, dan 2,8 mL air selanjutnya dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum dan direplikasi pengukurannya sebanyak 10 kali, selanjutnya diketahui nilai standar deviasi (SD) dan koefisien variasi (%RSD) (Fahira *et al.*, 2021).

4.5. Akurasi. Akurasi 80% dipipet 1,5 mL larutan baku kuersetin 125 ppm lalu dilarutkan ke dalam labu tentukur 5 mL kemudian ditambahkan dengan etanol p.a hingga tanda batas. Akurasi 100% dipipet 3 mL larutan baku kuersetin 125 ppm lalu dilarutkan ke dalam labu tentukur 5 mL kemudian ditambahkan dengan etanol p.a sampai tanda batas. Akurasi 120% dipipet 4 mL larutan baku kuersetin 125 ppm lalu dilarutkan ke dalam labu tentukur 5 mL kemudian ditambahkan dengan etanol p.a sampai tanda batas. Selanjutnya dipipet 0,5 mL dimasukan kedalam labu tentukur 5 mL direaksikan dengan 1,5 etanol p.a, 0,1 mL *Alumunium klorida* 10%, 0,1 mL *natrium asetat*, dan 2,8 mL air. Masing-masing dibuat hingga 3 labu tentukur dengan volume yang sama lalu dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan spektrofotometer UV. Nilai yang didapatkan dihitung nilai %*recovery* atau nilai perolehan kembali (Irnawati *et al.*, 2016).

E. Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada uji kadar flavonoid dihitung berdasarkan dari persamaan regresi linier berdasarkan kalibrasi larutan standar kuersetin dari hasil pembacaan alat spektrofotometri UV-Vis. Hasil kadar flavonoid akan dianalisis dengan menggunakan analisis *software* SPSS. Hasil kadar yang didapat diuji normalitas apabil terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan homogenitas jika data dinyatakan homogen maka dilanjutkan dengan analisis *One Way Annova* dan uji Tukey untuk melihat secara statistik terdapat perbedaan dari sampel ekstraksi maserasi dan sokletasi dengan perbandinga pelarut etanol 70% dan etanol 96%.