

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah suatu objek sasaran dalam penelitian. Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun nangka (*Artocarpus heterophyllus Lam.*) yang di dapatkan di Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel adalah data yang diambil berdasarkan kriteria yang dibutuhkan, sehingga syarat random dan representif akan terpenuhi. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun nangka (*Artocarpus heterophyllus Lam.*) dengan kriteria daun masih segar berwarna hijau dan belum berwarna kuning.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah kandungan senyawa flavonoidekstrak etanol daun nangka (*Artocarpus heterophyllus Lam.*)

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat dikategorikan dalam beberapa variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

2.1 Variabel Bebas. Variabel bebas merupakan variabel yang variasinya dapat mempengaruhi terhadap hasil dari variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak yang dihasilkan dari daun nangka (*Artocarpus heterophyllus Lam.*).

2.2 Variabel Tergantung. Variabel tergantung merupakan pokok persoalan kriteria dalam penelitian. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu kadar flavonoid total daun nangka (*Artocarpus heterophyllus Lam.*).

2.3 Variabel Terkendali. Variabel terkendali merupakan variabel yang memiliki pengaruh pada variabel tergantung perlu penetapan agar hasil spesifik dan dapat diteliti ulang oleh peneliti berikutnya. Variabel terkendali meliputi kondisi peneliti, kondisi alat, pelarut yang digunakan, dan kondisi lingkungan.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun nangka diambil dari Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah yang dipilih daun tidak terlalu muda atau tua, memiliki

warna hijau pangkal daun sampai ujung daun yang masih segar harus bebas dari hama dan penyakit dan sudah dilakukan uji determinasi.

Kedua, serbuk daun nangka adalah serbuk daun nangka yang diproses dengan tahapan pencucian pengeringan, penyerbukan, dan pengayakan dengan mesh 60.

Ketiga, ekstrak daun nangka adalah ekstrak daun nangka yang didapatkan melalui proses ekstraksi maserasi dan sokletasi dengan menggunakan variasi pelarut etanol 70% dan 96%.

Keempat, maserasi adalah ekstraksi yang dilakukan pengulangan dan penambahan pelarut setelah didapatkan maserat.

Kelima, sokletasi adalah ekstraksi yang dilakukan dengan serbuk dibungkus dalam kertas saring dan diikat benang dan dimasukkan kedalam labu soklet sampai siklus tidak berwarna lagi.

Keenam, Uji kualitatif adalah uji yang dilakukan dengan pemeriksaan untuk identifikasi flavonoid menggunakan uji tabung untuk identifikasi senyawa yang ada pada ekstrak daun nangka.

Ketujuh, kadar flavonoid total adalah kadar flavonoid total yang ditetapkan dengan spektrofotometri UV-Vis, setelah direaksikan dengan pereaksi AlCl_3 dan natrium asetat dengan baku pembanding kuersetin.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan maserasi, *moisture balance*, labu alas bulat, kain flannel, ayakan no.60, beaker glass (*pyrex*) 50 mL, beaker glass (*pyrex*) 100 mL, cawan penguap, beaker glass (*pyrex*) 10 mL, labu tentukur (*pyrex*), timbangan analitik (*Ohaus*), pipet volume, pipet tetes, spatula, kaca arloji, corong kaca 50 mm (*Herma*), gelas ukur (*Pyrex*) 25 mL, spektrofotometer UV-Vis, tabung reaksi, labu ukur dan batang pengaduk.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), kuersetin, magnesium, HCl, etanol p.a, etanol 70%, etanol 96%, FeCl_3 , kloroform, amoniak, natrium asetat, dan AlCl_3

D. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Daun Nangka

Determinasi bertujuan untuk memastikan bahwa daun nangka

(*Artocarpus heterophyllus* Lam.) yang digunakan pada penelitian ini sesuai dengan jenis dan spesies dari tanaman yang diinginkan (Soemarie *et. al.*, 2016). Determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Pengambilan Sampel Daun Nangka

Sampel penelitian yang digunakan adalah daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) yang diperoleh dari Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Daun yang digunakan adalah daun tidak terlalu muda atau tua, memiliki warna hijau pangkal daun sampai ujung daun yang masih segar harus bebas dari hama dan penyakit dan sudah dilakukan uji determinasi.

Pembuatan simplisia daun nangka diawali dengan memetik daun segar, dikumpulkan, lalu dicuci menggunakan air mengalir dengan tujuan untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun, lalu ditiriskan.

3. Pengeringan Daun Nangka

Daun nangka yang sebelumnya telah diambil kemudian dicuci bersih selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan sinar matahari sampai diperoleh daun yang kering. Daun yang telah dikeringkan ditimbang sebagai berat kering yang selanjutnya dilakukan perhitungan persentase berat daun kering terhadap berat daun basah.

Tujuan dari pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak dan tidak ditumbuhi jamur dalam penyimpanan jangka lama, menghemat tempat penyimpanan, serta menghentikan proses enzimatis sehingga metabolisme golongan senyawa yang ada dalam daun nangka dapat dihentikan.

4. Pembuatan Serbuk Daun Nangka

Daun nangka yang telah dikeringkan dengan sinar matahari, selanjutnya dibuat serbuk menggunakan blender untuk mendapatkan serbuk daun nangka. Tujuannya adalah untuk memperbesar luas permukaan kontak antara daun nangka dengan cairan penyari, sehingga golongan senyawa yang ada dalam daun nangka dapat tersari sempurna. Serbuk kering selanjutnya diayak dengan pengayak nomor 60 untuk memastikan keseragaman ukuran halus serbuk. Hasil dari serbuk kering daun nangka disimpan dalam plastik ukuran besar.

5. Identifikasi Serbuk Daun Nangka

5.1 Organoleptik Serbuk. Analisis serbuk simplisia daun

angka dilakukan secara organoleptis, dengan berdasarkan bentuk, warna, ukuran dan bau dari serbuk daun angka yang diuji.

5.2 Penetapan Susut Pengerinan. Susut pengeringan serbuk menggunakan alat *moisture balance* pada suhu 105°C. Serbuk daun angka yang digunakan sebanyak 2 gram ditimbang, dimasukkan ke dalam alat plat dan ditunggu sampai hasilnya keluar untuk setiap pengukuran. Hasil pengukuran berupa angka dalam persen yang terdapat pada layar dicatat. Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan mencari rata-rata dari ketiga hasil. Hasil penetapan susut pengeringan yang baik yaitu tidak lebih dari 10% (Depkes RI, 2008).

5.3 Penetapan Kadar Air. Kadar air serbuk menggunakan alat penampung labu ukur 500 mL disambungkan dengan pendingin air balik juga ada kelengkapan tabung penerima 5 mL dengan skala 0,1 mL. Metode ini diterapkan melalui cara penimbangan serbuk daun angka 20 gram lalu memasukkannya ke labu destilasi serta menambahkan pelarut toluen jenuh air 200 mL lalu dipasangnya alat *Sterling Bidwell*. Alat *Sterling Bidwell* digunakan untuk mengukur kadar air dengan dilihat dari volume dalam skala alat tersebut. Perhitungan kadar air dinyatakan dalam % v/b (Depkes, 2008).

6. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Angka

6.1 Maserasi. Cara ekstraksi simplisia daun angka dilakukan dengan metode maserasi dengan cara menimbang serbuk daun angka sebanyak 50 gram serbuk kemudian dimasukkan ke dalam maserator, kemudian ditambahkan masing masing pelarut etanol 70% dan 96% sebanyak 500 mL. Simplisia direndam selama \pm 6 jam dan dilakukan pengadukan sesering mungkin lalu didiamkan selama 18 jam. Hasil maserat dipisahkan, kemudian dilakukan perendaman serbuk kembali sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah volume sebanyak setengah kali jumlah volume penyarian pertama. Maserat yang sudah terkumpul kemudian diuapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental. Maserat yang didapatkan disaring pertama dengan kain flannel dan saringan kedua menggunakan kertas saring filtrat ditampung. Kemudian semua maserat dikumpulkan dan dipampatkan hingga diperoleh ekstrak pekat. Hitung hasil rendemen dari ekstrak daun angka.

6.2 Sokletasi. Cara ekstraksi sokletasi yaitu dengan 50 gram serbuk dibungkus dengan kertas saring dan diikat benang dimasukkan ke dalam alas bulat pada soklet. Etanol yang digunakan yaitu etanol 70%

dan etanol 96%. Sokletasi dilakukan pada suhu 70°C sampai tetesan siklus tidak berwarna lagi. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *water bath* pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental etanol

7. Identifikasi Ekstrak Etanol Daun Nangka

Identifikasi ekstrak kental daun nangka dilakukan secara organoleptis berdasarkan bentuk, warna, dan bau dari ekstrak daun nangka.

8. Analisis Kualitatif Identifikasi Kandungan Senyawa

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

8.2 Identifikasi Flavonoid. Skrining fitokimia dilakukan dengan metode tabung untuk identifikasi senyawa flavonoid menggunakan serbuk magnesium. Identifikasi dengan menimbang 0,5 gram ekstrak kental kemudian dilarutkan dengan 10 mL air panas dididihkan selama 5 menit. Kemudian menyaring larutan ekstrak, dan diperoleh filtrat A. Diambil sebanyak 5 mL filtrat A kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,2 gram kemudian ditambahkan HCl pekat sebanyak 1 mL dan ditambahkan amil alkohol sebanyak 1 mL kemudian dikocok kuat dan didiamkan beberapa saat hingga larutan memisah. Hasil positif (+) ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol, maka sampel dinyatakan negatif (-) tidak adanya flavonoid (Depkes RI, 1987).

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

8.4 Identifikasi Tanin. Pada identifikasi ini serbuk dan ekstrak daun nangka ditimbang sebanyak 0,05 gram ditambah air sebanyak 10 mL air panas dan dilakukan penambahan 1 tetes larutan FeCl₃. Tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman

(Depkes RI, 1979).

8.5 Identifikasi Triterpenoid dan Steroid. Identifikasi ini dilakukan dengan penimbangan serbuk dan ekstrak daun nangka sebanyak 0,1 gram dimasukkan cawan penguap ditambah 5 mL etanol 70% setelah dipanaskan dalam penangas air selama 2 menit. Penyaringan dilakukan 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 *Lieberman- 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).

9. Analisis Kuantitatif Spektrofotometri UV-Vis

9.1 Preparasi Larutan Baku Kuersetin. Serbuk kuersetin ditimbang 11,1 mg, setelah itu dilarutkan menggunakan etanol p.a menggunakan gelas beaker, lalu dimasukkan pada labu tentukur 100 mL hingga tanda batas sehingga didapatkan 111 ppm.

9.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum. Panjang gelombang dilakukan dengan cara mengambil 0,5 mL larutan baku kuersetin 44,4 ppm, kemudian direaksikan dengan penambahan 1,5 etanol p.a, natrium asetat 0,1 mL, 0,1 mL alumunium klorida 10% dan air 2,8 mL. Larutan dihomogenkan sampai larut lalu dipilih panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi yang paling tinggi.

9.3 Operating Time. *Operating time* kuersetin dilakukan dengan cara mengambil 0,5 mL dari larutan 44,4 ppm, kemudian direaksikan dengan penambahan 1,5 etanol p.a, natrium asetat 0,1 mL, 0,1 mL alumunium klorida 10% dan air 2,8 mL. Larutan dihomogenkan sampai larut.

9.4 Penetapan Kurva Baku. Larutan baku dibuat variasi konsentrasi dengan 6 variasi konsentrasi yaitu 44,4 ppm, 55,5 ppm, 66,6 ppm, dan 77,7 ppm, 88,8 ppm, dan 99,9 ppm. Larutan dipipet masing-masing 2 mL, 2,5 mL, 3 mL, 4 mL, 4,5 mL dari larutan dimasukkan ke dalam 5 mL labu tentukur dengan etanol p.a hingga tanda batas, selanjutnya dipipet 0,5 mL di masukkan ke labu tentukur 5 mL dan direaksikan dengan penambahan 1,5 etanol p.a, natrium asetat 0,1 mL, 0,1 mL alumunium klorida 10% dan air 2,8 mL, kemudian

didiamkan selama *operating time*. Kurva standar diperoleh dari hubungan antara konsentrasi kuersetin dengan absorbansi.

10. Verifikasi Metode

10.1 Linearitas. Uji linearitas 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. Uji linearitas dilakukan dengan cara dipipet larutan induk 111 ppm dengan konsentrasi 44,4 ppm; 55,5 ppm; 66,6 ppm; 77,7 ppm; 88,8 ppm; dan 99,9 ppm dipipet 2 mL, 2,5 mL, 3 mL, 3,5 mL, 4 mL, dan 4,5 mL, dimasukkan dalam labu tentukur 5 mL dengan etanol p.a hingga tanda batas, kemudian dipipet 0,5 mL dari larutan direaksikan dengan penambahan 1,5 etanol p.a, natrium asetat 0,1 mL, 0,1 mL alumunium klorida 10% dan aquadest 2,8 mL. Absorbansinya dibaca menggunakan spektrofotometer UV VIS dan dihitung koefisien korelasinya (r).

10.2 Presisi. Uji presisi dilakukan dengan mengukur serapan larutan 44,4 ppm. Dilakukan dengan cara dipipet larutan baku 111 ppm sebanyak 2 mL dimasukkan dalam labu tentukur 5 mL kemudian ditambahkan dengan etanol p.a sampai tanda batas lalu dikocok hingga homogen, dipipet 0,5 mL dari larutan direaksikan dengan penambahan 1,5 etanol p.a, natrium asetat 0,1 mL, 0,1 mL alumunium klorida 10% dan aquadest 2,8 mL dan dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum dan direplikasi pengukurannya sebanyak 10 kali, selanjutnya dapat diketahui nilai standar deviasi (SD) dan koefisien variasi (%RSD) dari data yang didapatkan.

10.3 Akurasi. Akurasi 80% dipipet 2 mL larutan baku 111 ppm lalu dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 mL kemudian ditambahkan dengan etanol p.a sampai tanda batas. Akurasi 100% dipipet 3 mL larutan baku 111 ppm lalu dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 mL kemudian ditambahkan dengan etanol p.a sampai tanda batas. Akurasi 120% dipipet 4 mL larutan baku 111 ppm lalu dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 mL kemudian ditambahkan dengan etanol p.a sampai tanda batas. Masing-masing larutan dipipet 0,5 mL direaksikan dengan penambahan 1,5 etanol p.a, natrium asetat 0,1 mL, 0,1 mL alumunium klorida 10% dan aquadest 2,8 mL Masing-masing dibuat hingga 3 labu tentukur dengan volume yang sama lalu

dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai yang didapatkan dihitung nilai % *recovery* atau nilai perolehan kembali.

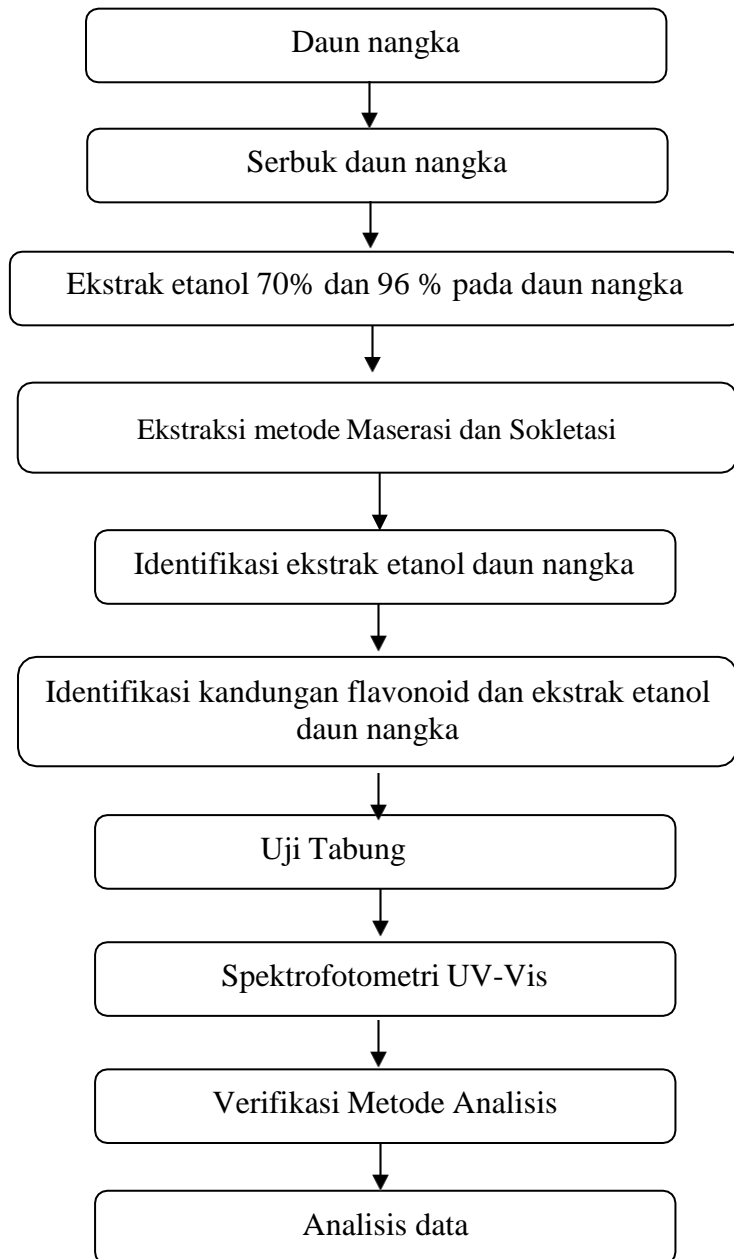
10.4 Batas Deteksi (*Limit Of Detection, LOD*). LOD yaitu batas deteksi dihitung secara statistik melalui persamaan regresi linier dari kurva baku. Perhitungan dapat dilakukan dengan cara memasukkan absorbansi larutan baku hasil pengukuran ke dalam persamaan regresi linier yang diperoleh (Irnawati *et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

10.5 Batas Kuantifikasi (*Limit Of Quantification, LOQ*). LOQ yaitu konsentrasi terendah suatu analit yang dapat ditentukan dengan presisi dapat diterima (pengulangan) dan akurasi dibawah kondisi yang dinyatakan tes.

11. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Penetapan kadar flavonoid total dari keempat ekstrak dengan menimbang ekstrak sebanyak 5 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 mL labu takar dengan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan dipipet masing-masing sejumlah 0,5 mL ke dalam labu tentukur 5 mL dan direaksikan dengan penambahan 1,5 etanol p.a, natrium asetat 0,1 mL, 0,1 mL alumunium klorida 10% dan air 2,8 mL, serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan panjang gelombang yang diperoleh saat mencapai *operating time*. Persamaan regresi linear merupakan hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi, serta menentukan koefisien korelasinya, kemudian dibuat kurva hubungan antara konsentrasi dan absorbansi (Aminah, 2017).

E. Skema Penelitian



Gambar 8. Skema Penelitian

F. Analisis Data

Data yang diperoleh mengandung golongan senyawa aktif diidentifikasi uji tabung untuk mengidentifikasi senyawa yang ada pada daun nangka. Dilanjutkan analisis kuantitatif pada ekstraksi etanol 70%

dan 96% daun nangka dengan perbandingan metode maserasi dan sokletasi menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Data hasil absorbansi dianalisis menggunakan analisis SPSS. Hasil kadar yang didapat dilakukan uji Saphiro-Wilk Test berguna agar dapat memahami data yang didapat terdistribusi normal atau tidak. Data yang memiliki kenormalan distribusi tersebut dilakukan pengujian homogenitas. Dinyatakan homogen suatu data homogen apabila $p > 0,05$. Selanjutnya data homogen dianalisis menggunakan metode One Way ANOVA dan uji Kruskal Wallis untuk data yang tidak normal, terdapat perbedaan dari ekstrak etanol 70% dan 96% daun nangka hasil ekstraksi metode maserasi dan sokletasi.