

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran dalam suatu penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah manjakani (*Quercus infectoria*) yang diperoleh dari daerah Yogyakarta, Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan suatu penelitian. Sampel yang digunakan adalah buah manjakani (*Quercus infectoria*) yang dipanen secara langsung dengan tangan. Pemanenan biji dilakukan pada saat buah telah masak ditandai dengan sudah maksimalnya pertumbuhan buah atau polong dan biji yang didalamnya telah terbentuk sempurna. Kulit buah atau polong mengalami perubahan warna yang semula berwarna hijau berubah menjadi agak kekuningan dan mulai mengering yang diambil dari daerah Yogyakarta, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah analisis dan skrining fitokimia kromatografi lapis tipis ekstrak etanol buah manjakani (*Quercus infectoria*).

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas penelitian ini adalah buah manjakani. Variabel tergantung penelitian ini adalah hasil identifikasi kandungan senyawa aktif pada buah manjakani.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, buah manjakani adalah buah yang berasal dari tumbuhan buah manjakani dipetik dari buah yang berwarna hijau yang diperoleh dari daerah Yogyakarta, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak buah manjakani adalah hasil ekstraksi serbuk buah manjakani yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan Sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak buah manjakani.

1.2 Bahan kimia yang digunakan adalah aquadest, HCL 2N, pereaksi dragendroff, pereaksi mayer, pereaksi Liberman-buchard, uap ammonia, NaOH 10%, kloroform, FeCl₃ 5%, etil asetat, methanol, n-heksana, butanol, asam asetat glasial, H₂SO₄ 10%, , Larutan AlCl₃, larutan KOH 10% (Yuda, dkk.,2017).

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, rotary evaporator, pipet tetes, mikro pipet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, batang pengaduk, cawan porselin, chamber, hot plate, botol reagen 250 ml, oven, spatula, corong buchner, botol maserasi, beaker glass, sendok tanduk, kaca arloji, kain flannel, kertas whattman, blender.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Buah Manjakani

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan kebenaran sampel buah manjakani (*Quercus infectoria*), dengan mencocokkan ciri morfologi yang ada pada buah manjakani (*Quercus infectoria*) dengan acuan jurnal, serta dibuktikan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan Sampel

Sampel buah yang digunakan adalah buah yang diambil dari daerah Yogyakarta, Jawa Tengah. Pengambilan bahan sampel dilakukan dalam keadaan buah masih segar berwarna hijau, tidak busuk, dan tidak terserang hama. Sampel yang sudah dipetik dikumpulkan lalu dicuci bersih untuk membersihkan dari kotoran yang masih menempel.

3. Pembuatan serbuk

Buah manjakani yang dikumpulkan ditimbang sebanyak 500 gram. Potong – potong dan cuci bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel, tiriskan. Jemur buah manjakani dibawah sinar matahari langsung sampai kering. Simplisia yang sudah kering kemudian dibuat serbuk dengan mesin penggiling / grinding. Lalu

diayak menggunakan ayakan no 40 (Depkes RI, 2017).

4. Uji Organoleptik

Uji ini bertujuan untuk memberikan pengenalan awal terhadap simplisia dan ekstrak dengan menggunakan panca indra dengan mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa (Novitasari, Siti, Irfan ; 2021).

5. Identifikasi Buah Manjakani

a. Uji Makroskopis

Uji makroskopis bertujuan untuk mencari kekhususan bentuk morfologi dan warna simplisia kering buah manjakani. Uji ini dilakukan dengan cara pengamatan visual secara langsung dengan mengamati karakteristik simplisia (Novitasari, Siti, Irfan ; 2021).

b. Uji Mikroskopis

Uji mikroskopis bertujuan untuk menentukan fragmen pengenal yang terdapat pada buah manjakani, sehingga dapat mencegah pemalsuan simplisia. Uji ini dilakukan terhadap simplisia melalui pengamatan dibawah mikroskop. Letakkan serbuk diatas kaca objek. Tambahkan aquadest secukupnya dan tutup dengan kaca penutup. Preparat diamati dibawah mikroskop (Partiwisari, Astuti, Ariantari).

c. Uji Histokimia

Analisis histokimia adalah metode untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada jaringan tumbuhan secara kualitatif. Penelitian ini dilakukan dengan meletakkan serbuk diatas objek glass. Tambahkan dengan sedikit aquadest dan reagen sesuai golongan senyawa yang diujikan, seperti alkaloid dengan menggunakan pereaksi Bouchardat, flavonoid dengan NaOH 5%, Pati dengan larutan yodium 0,1 N, antarkuinon dengan pereaksi KOH 90%, tutup dengan kaca penutup. Preparat diamati dibawah mikroskop (Rahayu, Radita,Nurul ; 2021).

6. Uji Susut Pengerinan Serbuk Buah Manjakani

Uji susut pengerinan bertujuan untuk menetapkan besarnya senyawa yang hilang pada suatu proses pengeringan pada ekstrak. Metode yang digunakan dalam penelitian ini. Dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance* yang dilakukan pengambilan data sebanyak 3 kali. Angka yang muncul dalam satuan persen pada alat *moisture balance* dicatat sebagai kadar susut

pengeringan Pengujian ini dilakukan dengan cara memasukkan 2 gram serbuk buah manjakani yang sudah ditara. Wadah tersebut kemudian dimasukkan dalam alat *moisture balance*. Pengoprasian alat telah selesai jika alat tersebut berbunyi dengan ditandai adanya bunyi tertentu, kemudian catat hasil susut pengeringan (dalam satuan %). Cara yang sama diulangi 3 kali lagi (Kusnadi dan Egie, 2017).

7. Pembuatan Ekstrak Buah Manjakani

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menimbang 250 gram serbuk diekstraksi dengan pelarut etanol 96%. kemudian dimaserasi selama 2 hari. Maserasi pada hari pertama dilakukan dengan merendam serbuk buah manjakani dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1 : 10 sebanyak 2,5 L. Pada hari kedua menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 5 sebanyak 1,25 L sambil sesekali diaduk. Filtrat disaring untuk memisahkan filtrat dan maserat menggunakan kain flannel. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 40 °C sampai diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 2017).

8. Uji Bebas Etanol 96%

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui masih ada atau tidaknya etanol yang terkandung dalam ekstrak. Melakukan uji bebas etanol dengan memasukkan 1 ml ekstrak kental kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2 tetes H₂SO₄ dan 2 tetes asam asetat dan panaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol apabila tidak ada bau ester yang khas dari etanol (Tivani, Wilda, Anggy ;2021).

9. Uji Kandungan Kimia Ekstrak Buah Manjakani

Pembuatan larutan uji dengan melarutkan 500 mg ekstrak dalam 50 ml pelarut yang sesuai

a. Uji alkaloid

Sebanyak 2 ml larutan uji diuapkan diatas cawan porselin hingga mendapat residu. Larutkan residu yang didapat dengan 5 ml HCl 2N. Saring larutan, Larutan yang telah disaring dibagi kedalam 3 tabung reaksi. Tabung I sebagai control, tabung II tambah dengan 3 tetes pereaksi dragendroff, dan tabung III ditambah dengan 3 tetes pereaksi mayer melalui dinding tabung. Positif alkaloid jika terbentuk endapan jingga pada tabung ke II dan endapan kuning pada tabung III (Yuda, dkk.,2017).

b. Uji flavonoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak kental dilarutkan dalam etanol dan

masukkan dalam tabung reaksi. Tambahkan amil alkohol, lalu kocok dengan kuat kemudian biarkan hingga memisah. Positif flavonoid jika terbentuk warna merah atau coklat pada lapisan amil alkohol (Yuda, dkk.,2017).

c. Uji Tanin

Sebanyak 2 ml larutan uji dimasukkan kedalam 2 tabung reaksi, Tabung I sebagai control dan tabung II tambah dengan beberapa tetes larutan $FeCl_3$ 5%. Positif tanin jika terbentuk warna hijau gelap/biru (Yuda, dkk.,2017).

d. Triterpenoid/Steroid

Sebanyak 2 ml larutan uji diuapkan dalam cawan penguap hingga mendapatkan residu. Larutkan residu yang didapat dengan 0,5 ml kloroform dan masukkan dalam tabung reaksi. Tambahkan 0,5 ml asam asetat anhidrat dan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Positif triterpenoid jika terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan, sedangkan positif steroid jika terbentuk cincin berwarna biru kehijauan (Yuda, dkk.,2017).

e. Antarkuinon

Sebanyak 50 mg ekstrak ditambah dengan 10 ml air lalu panaskan selama 5 menit dan saring. Sebanyak 3 ml larutan dimasukkan dalam 2 tabung reaksi, tabung I ditambah beberapa tetes larutan NaOH 1 N. Positif bila terbentuk adanya larutan berwarna merah, dan tabung II sebagai control (Yuda, dkk.,2017).

f. Saponin

Sebanyak 4 ml larutan uji ditambahkan dengan 5 ml aquadest, kocok dan lihat adanya busa stabil. Sebanyak 5 ml air tambahkan sedikit ekstrak, kocok dan lihat terbentuk busa stabil (busa setinggi 1 cm dan stabil selama 3 menit). Sebanyak 4 ml larutan uji masukkan dalam tabung reaksi sebagai control (Yuda, dkk.,2017).

10. Kromatografi Lapis Tipis

Penyiapan fase diam silica gel G60 F254/Plat KLT dengan Panjang 8 cm dan lebar 2 cm kemudian dicuci dengan methanol, lalu diaktivasi dengan oven pada suhu $100^{\circ}C$ selama 10 menit. Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 1 ml etanol kemudian ditotolkan pada fase diam (Yuda, dkk.,2017).

a. Identifikasi senyawa alkaloid

Fase gerak yang digunakan adalah n-heksan : etil asetat (7 : 3), dengan menggunakan pereaksi dragendroff. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya noda berwarna merah jingga setelah disemprot pereaksi dragendroff pada pengamatan sinar tampak dan berwarna biru pada UV 366 nm.

b. Identifikasi senyawa flavonoid

Fase gerak yang digunakan adalah asam asetat glacial : butanol : air (1 : 4 : 5), dengan menggunakan penampak noda uap ammonia. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya noda berwarna kuning coklat setelah diuapi ammonia pada pengamatan sinar tampak dan berwarna biru pada UV 366 nm (Yuda, dkk.,2017).

c. Identifikasi senyawa tannin

Fase gerak yang digunakan adalah methanol : air (6 : 4), dengan Penampak noda pereaksi FeCl_3 5%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna hitam (Yuda, dkk.,2017).

d. Identifikasi senyawa steroid

Fase gerak yang digunakan adalah kloroform ; methanol (9 : 1), dengan menggunakan penampak noda pereaksi Liberman-Buchard disertai dengan pemanasan pada suhu 105°C selama 5 menit. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya noda berwarna hijau biru (Yuda, dkk.,2017).

e. Identifikasi senyawa saponin

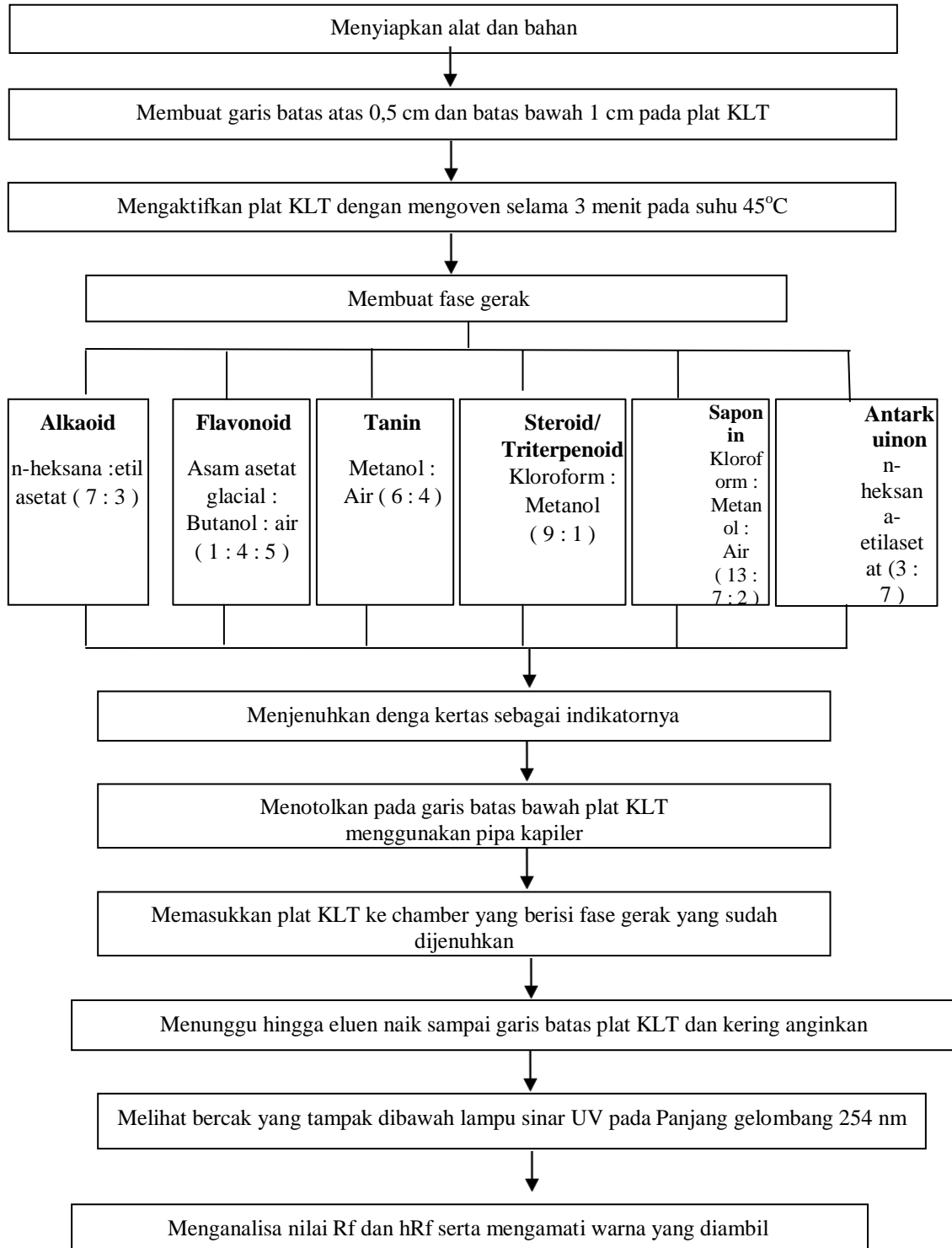
Fase gerak yang digunakan adalah kloroform : Metanol : Air (13 : 7 : 2), dengan penampak noda pereaksi anisaldehyd. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna noda kuning, kuning coklat, merah, ungu, hijau, dan lembayung.

f. Identifikasi senyawa antrakuinon

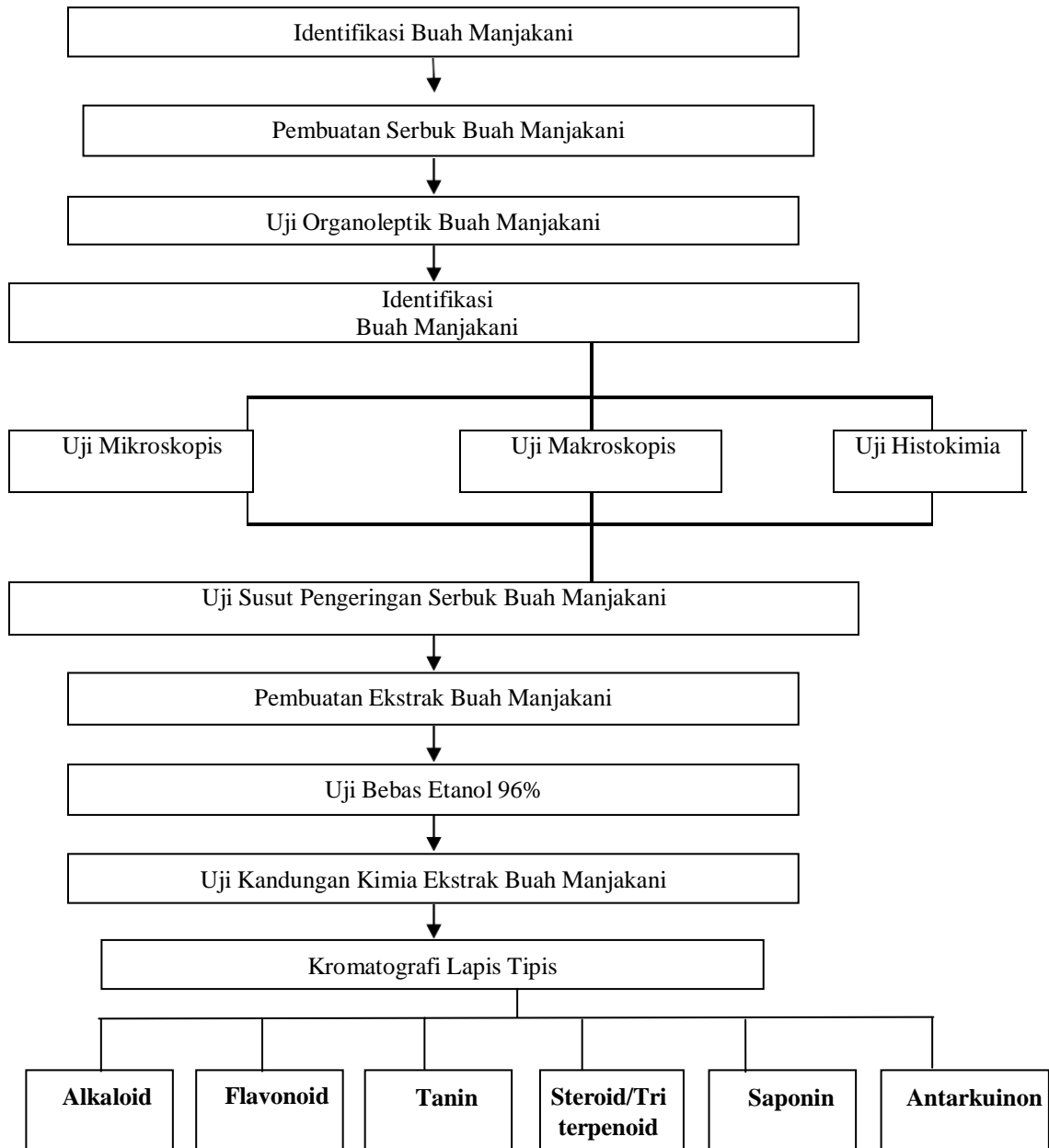
Fase gerak yang digunakan adalah n-heksan : etilasetat (3:7), dengan penampak noda larutan KOH 10% dalam methanol. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna noda kuning, kuning coklat, merah, ungu, hijau, dan lembayung (Yuda, dkk.,2017).

E. ANALISA HASIL

Analisis hasil dilakukan dengan menggunakan analisis deskriptif yaitudengan memperhatikan warna bercak/noda serta nilai R_f dan hR_f .



Gambar 7. Skema Kromatografi Lapis Tipis



Gambar 8. Skema Jalannya Penelitian