

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi merupakan keseluruhan dari sampel yang digunakan, pada penelitian ini yaitu Daun Kedondong muda dan tua yang diambil langsung dari pohonnya dari daerah Gumunggung, Kecamatan Banjarsari Kota Surakarta, Jawa Tengah, pada bulan Mei tahun 2024

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama yang digunakan dalam penelitian ini yaitu penetapan kadar fenolik total pada daun kedondong dengan variasi pelarut menggunakan spektrofotometri uv vis

#### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Variabel utama dapat diklasifikasikan menjadi 2 yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel terikat. Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi variabel terikat, variabel bebas penelitian ini adalah variasi pelarut yaitu etanol dan aquades. Variabel terikat yaitu variabel yang dipengaruhi variabel bebas, variabel terikat penelitian ini adalah kadar fenolik total pada ekstrak daun kedondong.

#### **3. Definisi Operasional Variabel Utama**

Pertama, fenolik adalah salah satu senyawa kimia yang terdapat dalam berbagai macam tumbuhan, memiliki cincin aromatik yang membawa satu atau lebih gugus hidroksil dan strukturnya dapat bervariasi dari molekul fenolik sederhana hingga kompleks polimer dengan berat molekul tinggi.

Kedua, daun kedondong adalah salah satu tanaman yang paling banyak diminati dan bermanfaat untuk pengobatan

Ketiga, variasi pelarut adalah suatu zat larut dalam zat lain yang menggunakan berbagai jenis pelarut yang dapat mempengaruhi kadar. Pada penelitian ini digunakan 2 variasi pelarut yaitu Etanol dan Aquades

Keempat, Kromatografi Lapis Tipis adalah parameter uji pemisahan senyawa kimia memanfaatkan perbedaan sampel terhadap lapisan adsorben dan fase gerak. Dengan fase diam silica gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak (n-butanol : asam asetat : aquadest) sebanyak (4 : 1 : 5).

Kelima, Spektrofotometri UV – Vis adalah alat yang digunakan dalam pengukuran transmisi, reflektansi serta absorbansi untuk mengukur bagian daerah ultraviolet.

### **C. Bahan dan Alat**

Bahan yang akan digunakan yaitu aquadest steril, baku asam galat, Etanol 96%, reagen NaOH 1%, reagen *Folin Ciocalteau*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu beaker glass, Erlenmeyer, waterbath, labu takar, serangkaian alat Spektrofotometri Uv Vis.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Pengumpulan Tanaman**

Tanaman yang digunakan yaitu daun kedondong. Daun kedondong yang telah didapat kemudian di timbang dan selanjutnya dilakukan determinasi tanaman untuk mengetahui apakah tanaman tersebut benar adanya.

#### **2. Determinasi Tanaman**

Determinasi simplisia dengan cara uji organoleptik yaitu dengan pengecapan rasa dan bau, selain itu uji secara makroskopik dengan cara melihat bentuk dari daun kedondong secara keseluruhan baik pangkal daun, helai daun, hingga ukuran serta warna.

#### **3. Pembuatan Simplisia**

Simplisia yang telah dikumpulkan kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan dari kotoran yang mengikut pada saat simplisia diambil. Setelah itu dilakukan pencucian untuk menghilangkan kotoran yang melekat pada simplisia. Dilakukan penirisan untuk menguapkan Sebagian air yang masih melekat pada simplisia. Setelah kering kemudian potong simplisia menjadi kecil kecil untuk memudahkan pengeringan. Kemudian dilakukan proses pengeringan yang bertujuan untuk memudahkan simplisia agar dapat disimpan dalam waktu yang lama. Setelah kering dilakukan sortasi kering untuk menghilangkan benda asing yang masih tertinggal bersamaan dengan simplisia

#### **4. Pembuatan Serbuk**

Pembuatan serbuk pada daun kedondong dilakukan dengan memasukkan simplisia yang telah kering ke dalam blender atau alat penggiling hingga berubah menjadi serbuk. Proses penggilingan

menggunakan alat atau bisa dengan blender, serbuk yang sudah jadi kemudian di ayak menggunakan ayakan no 60 (Siti, 2023).

## **5. Karakterisasi Serbuk**

**5.1 Susut Pengeringan.** Ditimbang sejumlah serbuk sebanyak 1 sampai 2 g simplisia dalam botol timbang dangkal yang tertutup dan telah dipanaskan, ratakan bahan dalam botol timbang. Buka tutup botol dan masukkan dalam oven dengan suhu 105°C, dan kemudian tunggu 1 jam, setelah selesai dinginkan dalam desikator sampai dingin dan timbang, lakukan hal yang sama sampai bobot konstan. (Farmakope Herba Indonesia)

**5.2 Pembuatan Ekstrak Serbuk** yang telah dikeringkan kemudian dimasukkan kedalam beker glass sebanyak 20 g pada 2 gelas dengan pelarut yang berbeda kemudian ditambah dengan aquades dan etanol sebanyak 200 mL, lalu diletakan dalam alat ultrasonikasi yang berfungsi sebagai pelarutan dengan efektif dan cepat, pelarutan ini didasarkan pada agitasi mekanis efek kavitasi yang menyebabkan gelombang ultra masuk ke dalam cairan kemudian atur waktu hingga 1 jam setiap pelarut (Hielscher).

## **6. Pembuatan larutan reagen NaOH 1%**

Ditimbang sebanyak 1 gram kristal NaOH dilarutkan dengan aquades steril hingga 10 mL. Larutan ini digunakan sebagai pereaksi agar folin dan sampel dapat bereaksi membentuk warna biru (Farmakope Herba Indonesia).

## **7. Pembuatan Baku Asam Galat**

Ditimbang dengan seksama baku asam galat sebanyak 1000 ppm dengan menimbang 10 mg baku asam gallat dilarutkan dengan 96% hingga volume 10 mL. dari larutan stock diambil 1 mL diencerkan dengan etanol 96% hingga volume 100 mL hingga dihasilkan konsentrasi 100 ppm dan dibuat seri konsentrasi sebanyak 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm, dalam 10 mL labu takar dengan pelarut yang sama.

## **8. Pembacaan senyawa fenolik secara Kualitatif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Pembacaan fenol menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dengan fase diam berupa silica gel GF<sub>254</sub> dan dengan fase gerak menurut (Sulastrri) berupa (n-butanol : asam asetat : aquadest) sebanyak (4 : 1 : 5) dan dilakukan penjenuhan terlebih dahulu dengan kerta saring. Kemudian di fase diam digaris atas sebanyak 0,5 cm

sebagai batas elusi, dan di titik sekitar 1 cm untuk menotolkan sampel serta baku. Penotolan baku asam galat dan ekstrak daun kedondong berurutan mulai dari sebelah kiri. Setelah dirasa fase gerak sudah jenuh, masukkan plat KLT kedalam chamber dengan peletakkan sekitar 1cm dari dasar chamber, tunggu hingga elusi merambat hingga garis batas 0,5 diatas, kemudian ambil dan keringkan. Penampakan bercak pada UV 254 terjadi peredaman fluoresensi, setelah itu dilakukan penyemprotan  $\text{FeCl}_3$  apabila sampel mengandung senyawa fenolik maka bercak berwarna biru, Rf sampel akan sejajar dengan Rf baku apabila positif mengandung senyawa fenolik.

### **9. Pembacaan untuk Panjang Gelombang Maksimal**

Baku asam galat yang telah dibuat sebanyak 10 ppm kemudian di baca absorbansinya pada konsentrasi 50 ppm, kemudian ditambahkan 5 mL reagen Folin Ciocalteu dikocok dan dibiarkan selama 4 – 8 menit, tambahkan 4,0 mL larutan NaOH 1% lalu kocok hingga homogen. Tambahkan aquadest steril hingga tanda batas dan diamkan selama 1 jam pada suhu ruang dan dilakukan penentuan panjang gelombang yang dibaca pada rentang 750 – 780 nm, (Sulastris, dkk.,)

### **10. Pembacaan Operating Time**

Penentuan Operating Time digunakan baku dengan konsentrasi yang sama dan cara yang sama namun pemindaian selama 1 jam. (Nur Aini, 2017)

### **11. Penentuan Kurva Kalibrasi**

Pembacaan kurva baku kalibrasi yang di buat seri konsentrasi sebesar 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, dengan pelarut methanol pa. Diukur pada Panjang gelombang maksimal yang telah di dapatkan.

### **12. Penetapan Kadar Sampel**

Sampel ditimbang sebanyak 10 mg dimasukkan kedalam 10 ml labu takar dan dilarutkan dengan etanol 96% sampai tanda batas. Kemudian pipet 1 mL kemudian ditambahkan 5 mL reagen Folin Ciocalteu dikocok dan dibiarkan selama 4 – 8 menit, tambahkan 4,0 mL larutan NaOH 1% lalu kocok hingga homogen. Tambahkan aquadest steril hingga tanda batas dan diamkan selama 1 jam pada suhu ruang. Kemudian dibaca pada Panjang gelombang yang telah didapatkan, lakukan replikasi sebanyak 3x. Hasil absorbansi yang di dapat kemudian di masukkan ke persamaan  $y = a + bx$  Dimana y nilai

absorbansi, a nilai slope, dan b adalah nilai intersep sedangkan x adalah konsentrasi. Setelah x diketahui masukkan dalam rumus C regresi untuk menentukan kadar fenolik total pada ekstrak daun kedondong

### **E. Analisis Hasil**

Kadar senyawa fenolik total diperoleh dengan dua cara yaitu secara kualitatif dan kuantitatif. Untuk cara Kualitatif dengan membandingkan antara jarak eluen sampel dengan eluen baku yang mana apabila eluen sampel sama dengan eluen baku menunjukkan hasil yang sama dan setelah dilakukan penyemprotan menggunakan reagen  $\text{FeCl}_3$ , dapat dikatakan sampel tersebut mengandung senyawa fenolik . Untuk analisis secara kuantitatif menggunakan spektrofotometri yaitu dengan mengukur Panjang gelombang serta menentukan operating time yang digunakan sebagai acuan dalam menentukan nilai absorbansi untuk menghitung regresi linier dalam menentukan kadar sampel.