

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini ialah ekstrak daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum*.L)

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini ialah ekstrak daun nyamplung yang didapatkan dari ekstraksi dengan pelarut etanol dan variasi amplitudo ekstraksi (20%,40%, dan 60%)

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum*.L) dengan variasi amplitudo (20%,40%, dan 60%)

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama harus diidentifikasi dahulu, sehingga dapat digunakan untuk mengklasifikasikannya dalam berbagai variabel yakni variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali,

Variabel bebas ialah variabel yang tidak tergantung dengan variabel manapun, sehingga dalam penelitian ini yang dapat diklasifikasi sebagai variabel bebas ialah banyaknya pelarut yang digunakan

Variabel tergantung merupakan variabel yang bergantung pada variabel utama. Variabel tergantung yang dimaksud ialah persen kadar dari ekstrak daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum*.L)

Variabel terkendali ialah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung selain variabel bebas. Variabel terkendali yang dimaksud yaitu : keseragaman varietas dari tanaman yang digunakan, cara pembuatan ekstrak, dan kemurnian pelarut.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, ekstrak daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum*.L.) merupakan suatu ekstrak yang dihasilkan melalui ekstraksi dengan alat sonikasi yang menggunakan pelarut etanol selama 40 menit dengan estimasi amplitudo (20,40, dan 60).

Kedua, penetapan kadar flavonoid total menggunakan metode spektrofotometer UV-Vis.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan - bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini ialah daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum.L*) sebagai bahan utama untuk proses ekstraksi dengan menggunakan metode sonikasi. Bahan kimia yang digunakan yakni : etanol, toluena, NaNO_2 , AlCl_3 , HCl , NaOH , H_2SO_4 dan baku kuersetin

2. Alat yang digunakan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu set alat spektrofotometer UV-Vis dan sonikator, oven, mesin penggiling, ayakan mesh 60, neraca analitik, termometer, mikropipet, dan peralatan gelas kaca

D. Prosedur Penelitian

1. Determinasi

Determinasi sampel nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*), digunakan untuk menetapkan kebenaran sampel simplisia tanaman dengan cara mencocokkan ciri makroskopik untuk (fisik dan morfologi) dari tanaman, guna menghindari terjadinya kesalahan simplisia tanaman yang akan digunakan untuk tahap penelitian. (Darmayanto, *et al* 2019)

2. Pengumpulan bahan

Simplisia daun nyamplung yang telah lulus dari proses determinasi selanjutnya akan diseleksi kembali untuk memisahkan simplisia yang masih dalam keadaan baik dan yang kurang baik, sehingga ekstrak yang dihasilkan akan memiliki kualitas yang baik

3. Preparasi Sampel

Terdapat enam proses dalam tahapan ini, yaitu : sortasi basah, pencucian, pengeringan, sortasi kering, penggilingan dan pengayakkan. Sortasi basah bertujuan untuk menghilangkan bagian tanaman yang rusak, kotor dan tercemar dengan bahan asing lainnya, lalu dilanjutkan dengan pencucian. Sehingga keadaan bahan baku benar benar bersih. Setelah kedua proses pembersihan selesai akan dilakukan proses pengeringan dengan menggunakan oven pada suhu kamar yang diteruskan dengan sortasi kering. Selanjutnya, simplisia kering tersebut akan melalui proses penggilingan dan pengayakkan dengan menggunakan ayakan 40 mesh untuk mendapatkan bentuk serbuknya (Agoes, 2009)

4. Susut Pengerinan

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 2 g dan dimasukkan dalam botol timbang dangkal tertutup yang sebelumnya telah dipersiapkan (dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit, telah ditimbang dan diratakan). Masukkan kedalam eksikator dalam keadaan terbuka dan keringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Botol selalu dibiarkan dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu kamar setiap tahap pengeringan. Keringkan hingga bobot konsisten (Depkes RI, 2000)

$$\text{Susut Pengerinan \% : } \frac{\text{Berat Susut Pengerinan}}{\text{Berat Ekstrak Awal}} \times 100\%$$

5. Pembuatan Ekstrak Daun Nyamplung

Ekstrak daun nyamplung diperoleh dari proses ekstraksi dengan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Serbuk daun nyamplung yang telah didapatkan, ditimbang sebanyak 10 gram lalu dimasukkan dalam labu Erlenmeyer dengan penambahan pelarut etanol sebanyak 100 ml. Labu tersebut kemudian akan dimasukkan dalam gelas kimia yang telah berisi es batu untuk mencegah adanya kenaikan suhu akibat getaran yang dihasilkan (Wayan, *et al* 2020). Ekstraksi dilakukan pada variasi suhu : 20° 40 dan 60 selama 40 menit,. Hasil ekstraksi yang telah diperoleh di saring menggunakan kertas saring, selanjutnya dilakukan pengukuran bobot jenis lalu ekstrak baru dipekatkan pada rotary evaporator dengan suhu 50° (Padmasari *et al*, 2013)

6. Penetapan Bobot Jenis Ekstrak

Piknometer 25 ml, ditimbang (dalam keadaan bersih dan kering). Lakukan kalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan, lalu dinginkan hingga mencapai suhu 25°C. Suhu zat uji harus diatur hingga lebih kurang mencapai 20°C, kemudian masukkan ke dalam piknometer. Atur suhu piknometer yang telah diisi oleh zat uji tersebut hingga suhunya menjadi 25°C, kemudian lakukan penimbangan.

Lakukan pengurangan pada bobot piknometer kosong dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis dari suatu zat merupakan sebuah hasil yang akan diperoleh dengan cara membagi bobot zat dengan bobot air yang ada dalam piknometer (Dirjen POM, 2020).

7. Uji Fitokimia

7.1 Shinoda Test. 1 ml ekstrak ditambahkan 5 ml etanol 95% dan 2 ml HCl pekat melalui dinding tabung, kemudian ditambahkan dengan 0,5 serbuk Mg (Mukhlis dan Shanaz, 2012). Terbentuknya warna merah hingga jingga menunjukkan adanya senyawa flavonoid, jika terbentuk warna kuning – jingga, menunjukkan adanya senyawa flavon, kalkon dan auron (Hanani, 2015)

7.2 Uji NaOH. 2 ml ekstrak ditambahkan 2 sampai 4 tetes larutan NaOH 10% (Asih, 2009). Hasil positif flavonoid apabila ada perubahan warna menjadi kuning – kuning kecoklatan (Desandi, 2014)

7.3 Uji H₂SO₄. 4 tetes ekstrak ditambahkan dengan a sampai 4 tetes H₂SO₄ pekat, adanya perubahan warna menjadi merah hingga merah kecoklatan menandakan ekstrak tersebut mengandung flavonoid (Kadji, 2013)

8. Penyiapan Fase Gerak Kromatografi Lapis Tipis

Fase gerak yang akan digunakan pada penelitian ini adalah campuran dari Metanol : Kloroform : Eter (5 : 4 : 1) dan harus dijenuhkan terlebih dulu (Rafi, *et al* 2013).

9. Proses Kromatografi Lapis Tipis

Baku kuersetindan ekstrak daun nyamplung ditotolkan masing – masing sebanyak 5 µl pada plat silika gel 60 F₂₅₄, dengan batas jarak penotolan sekitar 2 cm atau dengan jarak antara dua titik pusat penotolan tidak kurang daripada 10 mm, lalu keringkan pada suhu ruangan. Lempeng yang telah kering tersebut kemudian dimasukkan ke dalam bejana kromatografi (sembari dipastikan bahwa posisi titik penotolan harus setidaknya 5 mm diatas permukaan fase gerak), tutup bejana dan tunggu fase gerak merambat hingga tigaperempat tinggi lempeng yang digunakan. Ketika proses elusi fase gerak telah berakhir, lempeng tersebut akan dikeringkan pada suhu ruangan guna mengeringkan sisa eluen yang ada, kemudian diangin – anginkan pada suhu ruang selama 5 menit untuk keperluan deteksi dibawah sinar UV 254 nm, sehingga nilai R_f bisa didapatkan dan noda yang terbentuk dapat diamati (Dirjen POM, 2020)

10. Preparasi Instrument Spektrofotometer Uv-vis

Spektrofotometri UV-Vis sebelum digunakan harus dihubungkan dengan perangkat komputer menggunakan kabel penghubung USB terlebih dahulu, selanjutnyaklik *software Ocean View/start, button/All, program/Ocean optics/Oceanview/Oceanview*

pada *Computer Personal Unit* (CPU). Pilih *QuickView/welcome screen/OK*, kemudian tekan tombol power pada sumber cahaya, diikuti dengan tombol power lampu deuterium, lampu halogen dan shutter, tunggu selama 15 menit untuk melakukan proses pemanasan (Werner and Erhan, 2016)

10.1. Pembuatan Larutan AlCl_3 . Pembuatan larutan AlCl_3 dilakukan dengan cara menimbang serbuk AlCl_3 sebanyak 1 gram dengan seksama, kemudian dilarutkan dengan aquades dalam labutakar 10 ml (Zhu, *et al* 2010).

10.2. Pembuatan Natrium Nitrit. Pembuatan larutan ini dilakukan dengan cara menimbang serbuk NaNO_2 sebanyak 0,5 gram dengan seksama, kemudian dilarutkan dengan aquades dalam labu takar 10 ml. (Zhu, *et al* 2010)

10.3. Pembuatan Baku Induk Kuersetin. Larutan baku kuersetin dibuat dengan cara menimbang dengan seksama baku kuersetin sebanyak 50mg, kemudian larutkan dengan etanol p.a dalam labu takar 50 ml (Cahyata, 2016)

10.4. Pembuatan Baku Kerja Kuersetin. Pembuatan baku kerja dilakukan dengan cara, mengambil 5 ml larutan baku induk, larutkan dengan etanol p.a dalam labu takar 10 ml (Cahyata, 2016)

10.5. Pembuatan Blanko. Larutan blanko dibuat dengan cara, memipet 4 ml p.a dicampurkan dengan 1 ml NaNO_2 , 1 ml AlCl_3 dan ditambahkan aquadest dalam labu takar 10 ml (Hermita, 2004)

10.6. Penentuan Gelombang Maksimum. Larutan untuk pengukuran gelombang maksimum dibuat terlebih dahulu. Larutan ini dibuat dengan mengambil baku kerja sebanyak 2 ml dan dilarutkan dengan etanol p.a pada labu takar 10 ml. Pembacaan dimulai dari panjang gelombang antara 250 – 317 nm (Nugraha dan Ghazali, 2014), selanjutnya data yang telah diperoleh akan digunakan untuk membuat kurva hubungan serapan dan panjang gelombang.

10.7. Pembuatan Kurva Standart Kuersetin. Baku kerja kuersetin dibuat menjadi series konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 ppm dalam labu takar 10 ml. Masing – masing seri pengenceran, dicampur dengan larutan NaNO_2 1 ml, larutan AlCl_3 1 ml, 2 ml etanol dan aquadest dalam labu ukur 10 ml. Serapan diukur pada gelombang maksimum yang telah diperoleh, kemudian buat persamaan regresi linier tentang hubungan konsentrasi vs absorbansi (Hermita, 2004)

10.8. Penyiapan Sampel Induk. Sampel induk dibuat dengan cara menimbang 25 mg ekstrak daun nyamplung, larutkan dengan sedikit etanol dalam beaker glass, kemudian masukkan labu takar 25 ml dan tambahkan etanol p.a hingga tanda batas.(Azizah, *et al* 2014)

10.9. Penyiapan larutan Kerja. Pembuatan larutan kerja dilakukan dengan cara mengambil 2 ml sampel induk, larutkan dengan etanol dalam labu takar 10 ml. Kemudian pipet sebanyak 0,5, campurkan dengan 1 ml etanol, 1 ml $AlCl_3$, 1 ml $NaNO_2$ dan larutkan dengan aquades pada labu takar 10 ml.(Azizah, *et al* 2014).

10.10. Penetapan Kadar Sampel. Penetapan kadar sampel dilakukan 3 kali pada gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan menggunakan larutan kerja yang telah dibuat (Hermita, 2004).

E. Teknik Analisis

Analisis hasil diperoleh dengan cara melakukan analisis senyawa flavonoid total menggunakan spektrofometer UV- Vis terhadap sampel yaitu ekstrak daun nyamplung. Penetapan kadar dilakukan dengan menggunakan regresi linear.