

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu penelitian deskriptif kualitatif dan kuantitatif. Penelitian dilakukan di laboratorium dengan tujuan untuk menentukan kadar total fenol dan flavonoid dalam ekstrak metanol daun Rambutan menggunakan metode ekstraksi sokletasi serta analisis dengan metode Spektrofotometri UV-Vis.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Januari hingga April 2024 di Laboratorium Bahan Alam Universitas Borneo Lestari untuk melakukan ekstraksi dan skrining fitokimia pada daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.). Selanjutnya, analisis untuk penetapan kadar total fenol dan flavonoid pada ekstrak metanol daun rambutan dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Borneo Lestari menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun varietas Antalagi dari pohon Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) yang tumbuh di Kabupaten Hulu Sungai Selatan.

3.3.2. Sampel

Sampel yang dipergunakan yaitu daun Rambutan (*Nephelium lappaceum L.*) varietas Antalagi yang diperoleh di Desa Karasikan, Kecamatan Sungai Raya, Kab. Hulu Sungai Selatan, Provinsi Kalimantan Selatan. Bagian yang diambil adalah daun berwarna hijau tua dalam keadaan segar, bebas dari cacat, dan dipetik pada pagi hari antara pukul 07.00-10.00 untuk memastikan kondisi stomata terbuka dan tertutup (Ratna *et al.*, 2018).

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam kajian ini adalah konsentrasi dari ekstrak metanol yang berasal dari daun Rambutan (*Nephelium lappaceum L.*).

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada kajian ini adalah nilai kadar total fenol dan flavonoid pada ekstrak metanol daun Rambutan (*Nephelium lappaceum L.*).

3.5. Alat dan Bahan

3.5.1. Alat

Untuk kajian ini, perlengkapan alat yang dipergunakan terdiri dari aluminium foil, batang pengaduk, cawan penguap, corong kaca (*pyrex*®), gelas kimia (*pyrex*®), gelas ukur (*pyrex*®), kaca arloji, labu ukur (*pyrex*®), mikropipet (*dragonlab*®), pipet pump, pipet tetes, pipet ukur

(*pyrex*®), *rotary evaporator* (IKRF®), seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis (SP-UV1100), seperangkat alat sokhlet, timbangan analitik (*Scout Pro*®), waterbath (Mettler®).

3.5.2. Bahan

Pada ini menggunakan bahan-bahan antara lain meliputi daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) varietas Antalagi, pelarut metanol (*merck*®), metanol p.a. (*merck*®), aluminium (III) klorida (AlCl_3) (*merck*®), Amil alcohol (*merck*®), aquadest (*water one*®), kuersetin p.a. (*sigma Aldrich*®), asam galat p.a. (*sigma Aldrich*®), reagen *Folin Ciocalteu* p.a. (*merck*®), ferri klorida (FeCl_3) p.a. (*merck*®), HCl 5N p.a. (*merck*®), magnesium sulfat (MgSO_4) p.a. (*merck*®), Na_2CO_3 p.a. (*merck*®), dan asam asetat 5% p.a. (*merck*®).

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Pengambilan Bahan

Daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) varietas Antalagi yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari daerah Kandangan, Hulu Sungai Selatan. Bagian tanaman yang diambil adalah daun berwarna hijau tua dalam keadaan segar, bebas dari cacat, dan dipetik pada pagi hari antara pukul 07.00 hingga 10.00 untuk memastikan stomata dalam keadaan terbuka dan tertutup (Ratna *et al.*, 2018).

3.6.2. Determinasi Tumbuhan Rambutan

Sampel daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) (*Nephelium lappaceum* L.) dideterminasi di Laboratorium Biologi FKIP MIPA

Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Tujuannya untuk memverifikasi dan memastikan keakuratan identitas tanaman yang akan digunakan dalam penelitian (Saputri & Susiani, 2018).

3.6.3. Pengolahan Simplisia

a. Pengumpulan daun Rambutan (*Nephelium lappaceum L.*)

Daun Rambutan (*Nephelium lappaceum L.*) yang berwarna hijau tua, segar, dan bebas dari cacat diambil sebanyak 2 Kg. Sampel tumbuhan ini dikumpulkan di Desa Karasikan, Kecamatan Sungai Raya, Kabupaten Hulu Sungai Selatan, Provinsi Kalimantan Selatan.

b. Sortasi basah

Sortasi basah bertujuan untuk menghilangkan kontaminan atau bahan asing serta bagian dari tanaman lain yang tidak diinginkan dari bahan simplisia. Kontaminan tersebut dapat berupa tanah, kerikil, rumput atau gulma, tanaman lain yang serupa, bahan yang rusak atau busuk, serta bagian tanaman lain yang perlu dipisahkan dan dibuang (Rakhmawatie & Marfu'ati, 2023).

c. Pencucian

Pencucian bertujuan untuk menghapus kontaminan seperti tanah, pupuk, atau mikroba, serta bahan asing lain yang menempel pada tumbuhan. Air yang digunakan harus bersih dan mengalir. Proses pencucian dilakukan dengan efisiensi agar zat-zat berkhasiat dari tumbuhan tetap terjaga (Rakhmawatie & Marfu'ati, 2023).

d. Perajangan

Proses perajangan dilakukan untuk mempercepat proses pengeringan dengan menggunakan pisau yang tepat dan alas yang sesuai. Pemotongan dilakukan dengan ukuran yang tidak terlalu tipis, minimal ketebalan 3 mm, untuk menjaga kandungan senyawa aktifnya (Setiarso *et al.*, 2018).

e. Pengeringan

Tahap pengeringan dapat dilakukan secara alami dengan cara menjemur daun terlindungi dari sinar matahari langsung, yang ditutupi dengan kain hitam hingga daun mengering sepenuhnya. Keringnya daun ditandai dengan kemudahan daun untuk dipatahkan. (Alina *et al.*, 2017).

f. Sortasi kering

Sortasi kering dilakukan secara manual untuk memastikan bahwa simplisia benar-benar bersih dari bahan asing. Proses ini melibatkan pemisahan tanaman yang telah dikeringkan dari partikel atau benda asing lainnya, seperti bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang mungkin masih melekat pada simplisia kering (Ristanti & Lailatul, 2019).

g. Penghalusan

Serbuk simplisia yang telah dikeringkan dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk halus, kemudian disaring dengan ukuran mesh 40 (Cock, 2020). Serbuk simplisia

disimpan dalam wadah bersih dan kering yang terlindung dari sinar untuk digunakan pada proses ekstraksi selanjutnya.

h. Perhitungan rendemen simplisia

Perhitungan rendemen simplisia, dalam persentase bobot (b/b) antara ekstrak yang dihasilkan dan bobot serbuk simplisia yang digunakan dapat dihitung menggunakan rumus berikut (Cock, 2020):

$$\% \text{ rendemen simplisia} = \frac{\text{bobot simplisia (akhir)}}{\text{bobot bahan baku (awal)}} \times 100\%$$

3.6.4. Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Rambutan Metode Sokletasi

Alat sokletasi dipasang, kemudian serbuk simplisia daun Rambutan sebanyak 30 g dibungkus dengan kertas saring, diikat dengan benang, dimasukkan ke dalam thimble soklet, dan kemudian pelarut metanol sebanyak 210 ml dituangkan ke dalam alas labu bundar (Vinca, 2023). Ekstraksi dilakukan dengan alat soklet pada suhu $\leq 55^{\circ}\text{C}$ hingga pelarut pada *tube extractor* tampak jernih (Ramayani *et al.*, 2021). Selanjutnya hasil ekstrak cair yang diperoleh diuapkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan *waterbath* dengan suhu $\leq 55^{\circ}\text{C}$ (Vinca, 2023). Ekstrak disimpan dalam kondisi khusus untuk mengontrol kelembapan, suhu, dan melindungi dari cahaya dengan baik. Kemudian, dilakukan perhitungan persentase rendemen ekstrak yang diperoleh menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

3.6.5. Skrining Fitokimia

a. Uji Fenol

Sampel ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) dilakukan penimbangan 0,1 g kemudian dilarutkan dalam 2 mL pelarut metanol dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes FeCl_3 10%. Perubahan warna menjadi hijau, merah, ungu, biru, atau hitam menunjukkan positif keberadaan senyawa fenolik (Ramadhan *et al.*, 2020).

b. Uji Flavonoid (*Wilstater Cyanidin Test*)

Sampel ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) penimbangan yang banyak 0,1gram dilarutkan dalam 2 mL pelarut metanol dalam tabung reaksi, selanjutnya tambahkan dengan 2 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl 5N serta 2 mL Amil alkohol. Keberadaan senyawa flavonoid akan menyebabkan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan Amil alkohol jika terdapat dalam sampel (Ramadhan *et al.*, 2020).

3.6.6. Penetapan Kadar Total Fenol dan Flavonoid

a. Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak Metanol Daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.)

Sebanyak 10 mg ekstrak metanol daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) ditimbang, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur berukuran 10 ml. Kemudian larutan tersebut dilarutkan dengan

metanol p.a., untuk menghasilkan larutan induk sampel dengan konsentrasi 1000 ppm (Ulya, 2020).

b. Penetapan Total Fenol

1. Pembuatan Larutan Induk Asam Galat

Sebanyak 10 mg Asam Galat dimasukkan ke dalam labu ukur berukuran 10 mL, kemudian larutan tersebut dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a., untuk menghasilkan larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm (Khadijah *et al.*, 2017).

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Sebanyak 0,5 mL dari larutan asam galat dengan konsentrasi 100 ppm dicampur dengan 5 mL reagen *Folin-Ciocalteu* yang sebelumnya telah diencerkan dengan aquadest dalam perbandingan 1:10. Campuran ini didiamkan selama 5 menit, kemudian ditambahkan 4 mL Na_2CO_3 1M. Larutan homogen ini kemudian dibiarkan diam pada suhu kamar dalam keadaan gelap selama 55 menit. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 700-800 nm (Ramadhan & Forestryana, 2021).

3. Penentuan *Operating Time*

Sebanyak 0,5 mL larutan asam galat dengan konsentrasi 100 ppm dicampur dengan 5 mL reagen *Folin-Ciocalteu* yang sebelumnya telah diencerkan dengan aquadest dalam perbandingan 1:10. Campuran tersebut diamkan selama 5 menit,

kemudian ditambahkan 4 mL larutan Na_2CO_3 1M. Setelah dicampur hingga homogen, larutan tersebut dibiarkan pada suhu kamar dan absorbansinya diukur setiap 2 menit dengan rentang waktu 90 menit pada panjang gelombang yang didapatkan (Ramadhan & Forestryana, 2021).

4. Pembuatan Kurva Baku Asam Galat

Larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm diambil sebanyak 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; dan 0,25 mL, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur berukuran 10 mL. Setelah itu, ditambahkan metanol p.a. hingga mencapai tanda batas 10 mL. Dengan demikian, diperoleh larutan asam galat dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm (Vinca, 2023).

Larutan seri kadar yang sudah dibuat dilakukan pengambilan 0,5 mL dan masuk ke dalam tabung reaksi, setelah itu ditambahkan 5 mL reagen *Folin-Ciocalteu* dilakukan pengenceran dengan 1:10) digojok. Diamkan selama 5 menit, masing-masing larutan ditambahkan Na_2CO_3 1 M sebanyak 4 mL, digojok sampai homogen, lalu didiamkan selama 60 menit pada suhu kamar dan dalam kondisi gelap. Pembacaan gelombangnya dengan seri kadar dipergunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui hasil yang didapat (Ramadhan & Forestryana, 2021).

5. Penetapan Kadar Total Fenol Ekstrak Metanol Daun Rambutan (*Nephelium lappaceum L.*)

Larutan induk ekstrak metanol daun Rambutan dengan konsentrasi awal 1000 ppm diencerkan menjadi 100 ppm. Kemudian, 0,5 ml larutan sampel yang telah diencerkan ditambahkan dengan 5 ml reagen *Folin-Ciocalteu* dan dicampur merata. Campuran diamkan selama 5 menit, kemudian ditambahkan 4 ml larutan Na_2CO_3 1M, diaduk hingga homogen, dan diamkan selama 60 menit pada suhu kamar. Absorbansi larutan ekstrak diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan (Sari & Ayuhecacia, 2017) dan untuk memastikan keakuratan data lakukan replikasi sebanyak 3 kali.

c. Penetapan Total Flavanoid

1. Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

Sebanyak 10 mg kuersetin ditimbang dan larutkan dalam 10 mL metanol p.a. hingga volume mencapai batas 10 mL pada labu ukur, sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm (Sari & Ayuhecacia, 2017).

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebanyak 1 mL larutan baku induk kuersetin 1000 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur berukuran 10 mL dan ditambahkan metanol p.a. sampai mencapai tanda batas, sehingga

terbentuk larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%, dan diamkan selama 30 menit. Setelah itu, dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 370-450 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimum yang menunjukkan nilai serapan tinggi (Sari & Ayuhecaria, 2017). Panjang gelombang yang menunjukkan absorbansi tertinggi disebut sebagai panjang gelombang maksimum (Candra *et al.*, 2021).

3. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* (OT) dilakukan dengan menggunakan larutan standar kuersetin. Sebanyak 1 mL larutan induk kuersetin 1000 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan metanol p.a. hingga tanda batas, sehingga tercapai konsentrasi 100 ppm. Larutan kerja kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1 mL, kemudian direaksikan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan ditambahkan 8 mL larutan asam asetat 5%. Campuran larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan interval waktu 2 menit dan pengukuran dilakukan selama 60 menit hingga diperoleh nilai absorbansi yang stabil (Sari & Ayuhecaria, 2017).

4. Pembuatan Larutan Baku Kerja Kuersetin

Larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm diambil sebanyak 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; dan 0,6 ml, lalu masing-masing larutan diencerkan dengan metanol sehingga memperoleh konsentrasi 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, dan 60 ppm. Setiap 1 ml dari larutan seri yang telah diencerkan ini kemudian dicampurkan dalam tabung reaksi dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Campuran ini kemudian didiamkan selama 30 menit. Setelah itu, absorbansi larutan uji diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan (Bakti *et al.*, 2017).

5. Penetapan Kadar Total Flavanoid

Sebanyak 1 mL sampel larutan ekstrak metanol daun Rambutan konsentrasi 1000 ppm ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Setelah diinkubasi selama 30 menit. Setelah itu absorbansi larutan tersebut diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan (Sari & Ayuhecacia, 2017) dan lakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk mendapatkan total kadar yang akurat.

3.7. Analisis Data

3.7.1. Analisis Data Kadar Total Fenol Ekstrak Daun Rambutan

Analisis data memakai persamaan regresi linear di mana nilai absorbansi larutan uji dimasukkan ke dalam rumus regresi $y = bx + a$,

dengan menggunakan larutan standar masing-masing. Kadar total fenol ditunjukkan dengan mikrogram asam galat ekuivalen per miligram ekstrak ($\mu\text{gGAE}/\text{mg}$) (Ready, 2016). Menurut Syamsul *et al.*, (2019) kadar total fenol dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Kadar Total Fenol} = \frac{C \times V \times Fp}{M}$$

Ket:

C = Konsentrasi asam galat (nilai x) (mg/L)

V = Volume ekstrak (L)

M = Massa sampel (g)

Fp = Faktor pengenceran

3.7.2. Analisis Data Kadar Total Flavonoid Ekstrak Daun Rambutan

Analisis data menggunakan persamaan regresi linier di mana nilai absorbansi larutan uji dimasukkan ke dalam persamaan regresi $y = bx + a$ yang telah sesuai dengan larutan standar masing-masing, sebagaimana dijelaskan oleh Salmia (2016). Kadar total flavonoid dinyatakan dalam mikrogram ekuivalen kuersetin per miligram ekstrak ($\mu\text{g QE}/\text{mg}$) sesuai dengan penelitian yang dilaporkan oleh Ramadhan *et al.*, (2021). Rumus perhitungan kadar total flavonoid adalah:

$$\text{Kadar Total Flavonoid} = \frac{C \times V}{M}$$

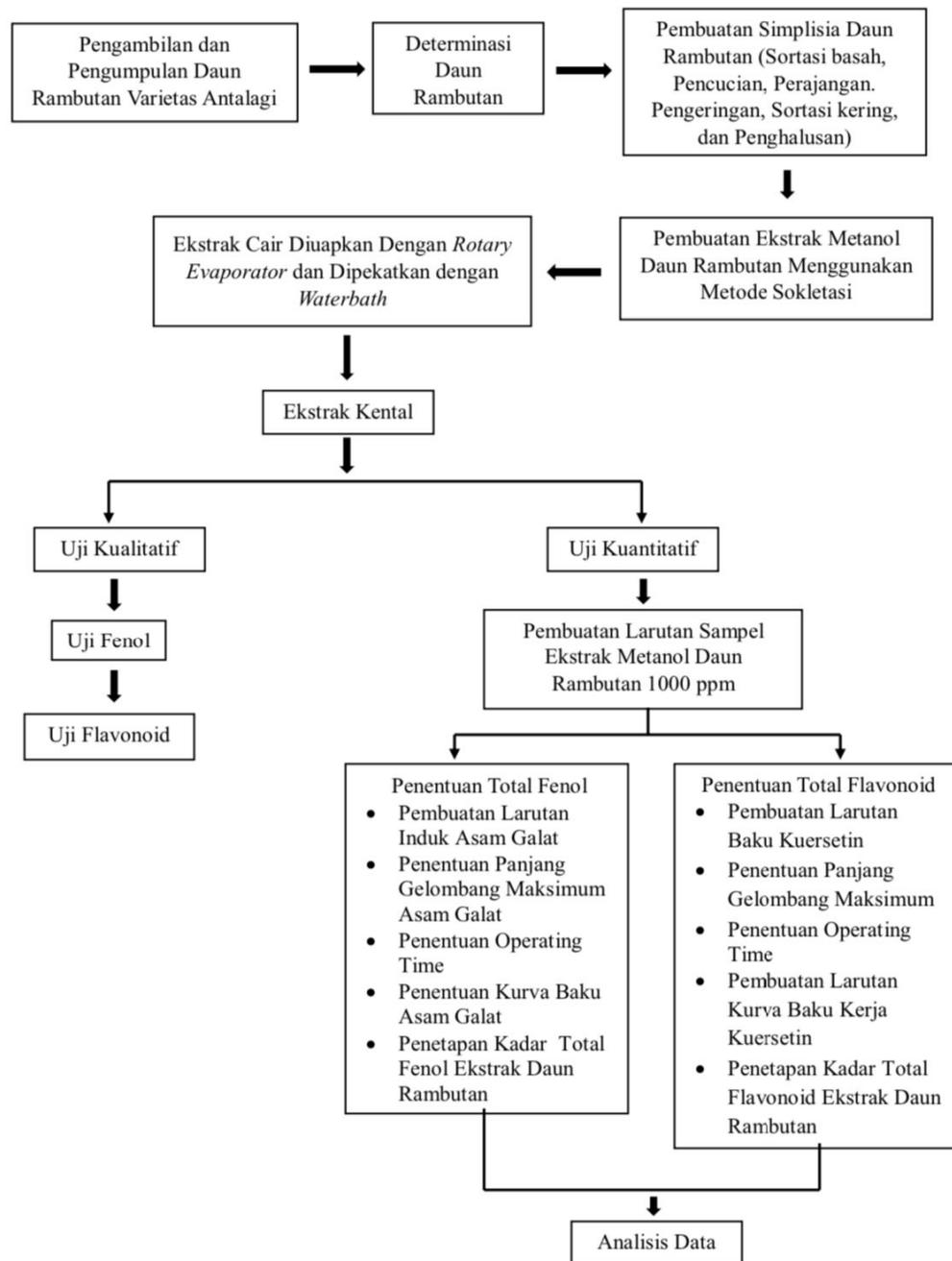
Ket:

C = Konsentrasi kuersetin (nilai x) (mg/L)

V = Volume ekstrak (L)

M = Massa sampel (g)

3.8. Skema Alur Penelitian



Gambar 12. Skema Alur Penelitian