

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian termasuk dalam kategori penelitian ekperimental yang bertujuan untuk mengukur kadar flavonoid total menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada infusa daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd), infusa daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*), sirup daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) dan sirup daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) dengan penambahan infusa daun pandan (*Pandanus amaryllifolius*) untuk meningkatkan kualitas aroma dan warna sediaan sirup.

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Kimia, dan Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi di Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Borneo Lestari, Kota Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Penelitian berlangsung mulai dari bulan Januari hingga Mei 2024.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi yang akan digunakan dalam penelitian ini berupa tanaman kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) dan pandan (*Pandanus amaryllifolius*) yang berasal dari diperoleh dari Landasan Ulin Utara, Kecamatan Liang Anggang, Kota Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini ialah daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) yang dijadikan sediaan sirup dan pandan (*Pandanus amaryllifolius*) yang dibuat menjadi ekstrak dengan metode infusa. Adapun sampel yang diuji pada penelitian ini yaitu sirup, sirup daun kelakai, sirup daun kelakai dengan penambahan infusa pandan, infusa daun kelakai dan infusa pandan. Sehingga total keseluruhan ada lima sampel yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus Federer yaitu:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan :

t = banyaknya pengulangan sampel

n = jumlah perlakuan sampel

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini meliputi konsentrasi uji infusa daun kelakai, konsentrasi uji infusa daun pandan wangi , konsentrasi uji sirup daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd), dan konsentrasi uji sirup daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) dengan penambahan infusa pandan (*Pandanus amaryllifolius*).

3.4.2 Variabel Terikat

Variable terikat pada penelitian ini meliputi kadar flavonoid total dari infusa daun kelakai, infusa daun pandan wangi, sediaan sirup daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd), serta sirup daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) dengan penambahan infusa daun pandan (*Pandanus amaryllifolius*).

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini meliputi batang pengaduk, beker glass (*Pyrex*®), corong kaca (*Pyrex*®), *blender*, gelas ukur (*Pyrex*®), kertas saring, kain panel, kuvet (*Quartz Cuvette*®), labu ukur (*Pyrex*®), neraca analitik (*Ohaus EP214*), pengayak (Standar *Sieves*®), spektrofotometri UV-Vis (*Shimadzu UV*

mini 1240), tabung reaksi (*Pyrex*®), aluminium foil (*Klin Pak*®), mikropipet (*Dragon Lab*®).

3.5.2 Bahan

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini meliputi kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) dan daun pandan (*Pandanus amaryllifolius*), gula jagung, aquadest, natrium benzoate, asam sitrat, aluminium klorida (AlCl_3) (*Merck*®), amil alcohol (*Merck*®), metanol p.a (*Merck*®), HCL 5 N, kuersetin (*Merck*®), NaOH, magnesium (*Merck*®), natrium asetat $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ (*Merck*®).

3.6 Alur Penelitian

3.6.1 Pengambilan Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd)

Tanaman Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) diperoleh dari Landasan Ulin Utara, Kecamatan Liang Anggang, Kota Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Bagian tanaman yang dipilih adalah bagian daun kelakai dengan kriteria muda, segar, dan berwarna merah (Hakim *et al.*, 2021).

3.6.2 Determinasi Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd)

Determinasi Daun Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) dilakukan di Laboratorium FMIPA Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru. Determinasi memiliki tujuan untuk mengetahui kebenaran identitas tanaman untuk menghindari adanya kesalahan dalam pengumpulan bahan atau sampel.

3.6.3 Pembuatan Simplisia Tanaman

Daun kelakai dan daun pandan yang telah dikumpulkan dilakukan sortasi basah yaitu proses pemisahan simplisia dari bagian tanaman yang tidak digunakan untuk memisahkan kotoran ataupun benda asing. Lalu dilakukan pencucian dengan air bersih yang mengalir dimaksudkan untuk menghilangkan kotoran baik berupa tanah atau kerikil dan bahan-bahan asing lainnya yang melekat pada simplisia. Setelahnya simplisia di potong kecil-kecil untuk mempermudah proses pengeringan (Nugroho, 2017).

Pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan dengan meletakkan simplisia pada tempat yang tidak terkena matahari secara langsung. Daun kelakai dan daun pandan yang sudah kering dilakukan sortasi kering untuk menjamin simplisia benar-benar bebas dari bahan asing, kemudian simplisia kering dihaluskan dilakukan dengan menggunakan *blender* hingga halus dan diayak hingga halus dengan pengayakan mesh 60 penghalusan ini untuk meningkatkan kontak antara luas permukaan simplisia dengan pelarut yang digunakan saat proses ekstraksi sehingga memudahkan pelarut menarik senyawa dari simplisia (Efrida *et al.*, 2023). Dilakukan perhitungan rendemen yang diperoleh dengan persentase bobot (b/b) antara ekstrak yang dihasilkan dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan

$$\% \text{ Rendemen Simplisia} = \frac{\text{Bobot simplisia akhir}}{\text{Bobot simplisia awal}} \times 100\%$$

3.6.4 Pengolahan Sirup daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd)

1. Pembuatan Infusa Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius*)

Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) memiliki fungsi sebagai penambah aroma dan warna alami pada pembuatan sirup daun kelakai dibuat dalam konsentrasi 10% b/v. Daun pandan wangi segar yang telah dicuci dan dipotong-potong sebelumnya, kemudian ditimbang sebanyak 10 gram, lalu daun pandan wangi yang sudah ditimbang sebanyak 10 gram dimasukkan ke dalam panci infusa dan tambahkan dengan 100 mL air. Setelah itu, panaskan diatas penangas air dan tunggu saat suhu mulai mencapai 90° dengan menggunakan thermometer, Ketika suhu sudah 90° barulah dilakukan perhitungan waktu untuk proses ekstraksi infusa yaitu selama 15 menit. Setelah 15 menit serkai ekstrak selagi panas dengan menggunakan kain flannel, lalu setelahnya tambahkan air panas secukupnya melalui ampas dari sisa penyaringan ekstraksi infusa hingga diperoleh volume infusa yang dikehendaki yaitu 100 mL (Firawati & Karlina, 2017).

2. Pembuatan Infusa Serbuk Daun Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd)

Infusa daun kelakai dibuat dengan perbandingan pada serbuk simplisia kelakai kering dan air yaitu 1 : 10. Pembuatannya dengan cara menimbang serbuk simplisia daun kelakai sebanyak

10 gram setelahnya dimasukkan ke dalam panci infusa dan tambahkan dengan 100 mL air. Setelah itu, panaskan diatas penangas air dan tunggu saat suhu mulai mencapai 90° dengan menggunakan thermometer, Ketika suhu sudah 90° barulah dilakukan perhitungan waktu untuk proses ekstraksi infusa yaitu selama 15 menit. Setelah 15 menit serkai ekstrak selagi panas dengan menggunakan kain flannel, jika volume tidak mencapai 100 mL, maka tambahkan air panas secukupnya melalui ampas dari sisa penyaringan ekstrak infusa hingga diperoleh volume infusa yang dikehendaki yaitu 100 mL (Mawaddah *et al.*, 2019; Ananta *et al.*, 2019).

3. Pembuatan Sirup daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) dengan Penambahan Infusa Daun Pandan (*Pandanus amaryllifolius*)

Pembuatan sirup menggunakan komposisi bahan seperti pada tabel 1. Pertama masukkan infusa daun kelakai dan infusa pandan kedalam gelas beker, kemudian memasukkan gula, sirup jagung, asam sitrat, natrium benzoat. Setelah itu dipanaskan diatas hot plate dan cukupkan volume hingga 100 mL sambil diaduk hingga semua terlarut. Setelah gula larut matikan hotplate kemudian sirup didinginkan lalu masukkan sirup kedalam botol. Kemudian dilakukan uji evaluasi sirup (Palimbong *et al.*, 2020).

4. Formulasi Sirup daun kelakai dengan Penambahan Daun Pandan

Tabel 1. Formulasi Sirup daun kelakai dengan Penambahan Infusa Daun Pandan

Bahan	Konsetrasi (% b/v)				
	F0	F1	F2	F3	F4
Infusa daun kelakai	0	10	10	10	0
Infusa Pandan	0	0	10	0	10
Gula	15	15	15	0	0
Sirup Jagung	15	15	15	0	0
Asam Sitrat	0,13	0,13	0,13	0	0
Natrium Benzoat	0,2	0,2	0,2	0	0
Air ad	100	100	100	100	100

5. Uji Mutu Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan menggunakan panca indera, pengujian dilakukan dengan mengambil masing-masing sampel sirup yaitu sirup daun kelakai dan sirup daun kelakai dengan penambahan infusa daun pandan (*Pandanus amaryllifolius*) sebanyak 5 mL kemudian diamati rasa, warna dan aroma khas (Hidayati *et al.*, 2021).

3.7 Skrining Fitokimia

3.7.1 Flavonoid

Sampel infusa daun kelakai, infusa daun pandan wangi, sirup daun kelakai dan sirup daun kelakai dengan penambahan infusa pandan wangi diambil dalam jumlah 1 mL kemudian ditambahkan dengan 2 mL metanol. Filtrat diambil sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambah dengan 0,5mL HCL Pekat lalu larutan tersebut ditambahkan dengan serbuk magnesium (Mg) sebanyak 1 mg dan 1 mL amil alkohol. Jika terjadi perubahan warna menjadi jingga atau merah jingga, ini menandakan sampel positif flavonoid (Rafli *et al.*, 2023).

Metode kedua sampel infusa daun kelakai dan daun pandan wangi diambil dalam jumlah 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan dengan 5 tetes pereaksi NaOH 10%, jika terbentuk warna merah, jingga dan kuning menunjukkan sampel positif flavonoid (Nurjannah *et al.*, 2022).

3.8 Penetapan Kadar Flavonoid Total

3.8.1 Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Dibuat larutan induk kuersetin dalam konsentrasi 1000 ppm dengan cara dilarutkan serbuk kuersetin sebanyak 10 mg didalam metanol 10 mL menggunakan labu ukur 10 mL (Adnan, 2018). Kemudian larutan baku induk kuersetin 1000 ppm di encerkan mencari 100 ppm dengan mengambil larutan larutan induk kuersetin

sebanyak 1 mL, lalu dilarutkan menggunakan metanol 10 mL didalam labu ukur 10 mL (Asmorowati & Lindawati, 2019).

3.8.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan kuersetin 100 ppm sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian tambahkan, 0,2 mL AlCl_3 10%, 0,2 mL natrium asetat 1 M dan aqua destilata hingga tanda batas. Kemudian vortex homogen lalu dibiarkan selama 30 menit. Absorbansinya diukur dengan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 370-450 nm (Lekal & Watuguly, 2017).

3.8.3 Pembuatan Seri Kadar Kurva Baku Kueretin

Sebelum dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis, terlebih dahulu larutan induk kuersetin konsentrasi 1000 ppm di encerkan menjadi 100 ppm, kemudian kuersetin 100 ppm dibuat dengan konsentrasi 5, 7,5, 10, 12,5 dan 15 ppm dari larutan masing – masing dipipet 0,5 mL ; 0,75 mL ; 1 mL ; 1,25 mL, dan 1,5 mL, kemudian dari masing-masing konsentrasi ditambahkan 3 mL metanol, 0,2 mL AlCl_3 10%, 0,2 mL natrium asetat 1 M, dan aquadest sampai tanda batas pada labu ukur 10 mL (Lekal & Watuguly, 2017; Adnan, 2018). Campuran tersebut didiamkan dalam waktu 30 menit dan absorbansi larutan uji diukur menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Apridamayanti *et al.*, 2021; Kusmardiyani *et al.*, 2016; Sari *et al.*, 2023; Fatmawati *et al.*, 2016; Sholikha *et al.*, 2019).

3.8.4 Penentuan Kadar Flavonoid Kelakai

Sampel infusa daun kelakai, infusa pandan dalam konsentrasi 10% serta sirup daun kelakai dan sirup daun kelakai dengan penambahan infusa pandan diambil sebanyak 4 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan dengan 3 mL metanol, dan 0,2 mL larutan AlCl_3 10%, serta tambahkan 0,2 mL natrium asetat 1M dan aquadest hingga tanda batas. campuran diinkubasi dalam waktu 30 menit dan dimasukkan ke dalam kuvet untuk pengukuran serapan pada panjang gelombang maksimum kuersetin menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Pengukuran juga dilakukan terhadap larutan blanko. Pengukuran dilakukan 5 replikasi. Kadar senyawa flavonoid ditentukan dengan persamaan regresi dari kurva kalibrasi (Adnan, 2018; Lekal & Watuguly, 2017).

3.9 Analisis Data

3.9.1 Analisis Data Kadar Total Flavonoid

Analisis data dilakukan dengan menggunakan persamaan regresi linier, di mana nilai absorbansi dari larutan uji dimasukkan ke dalam rumus $y = bx + a$ yang telah ditentukan berdasarkan larutan standar masing-masing (Salmia, 2016). Kadar total flavonoid diekspresikan sebagai total ekuivalen kuersetin per 1 mg ekstrak (μg QE/mg) (Ramadhan *et al.*, 2021). Kadar total flavonoid dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\frac{C \times V \times Fp}{M}$$

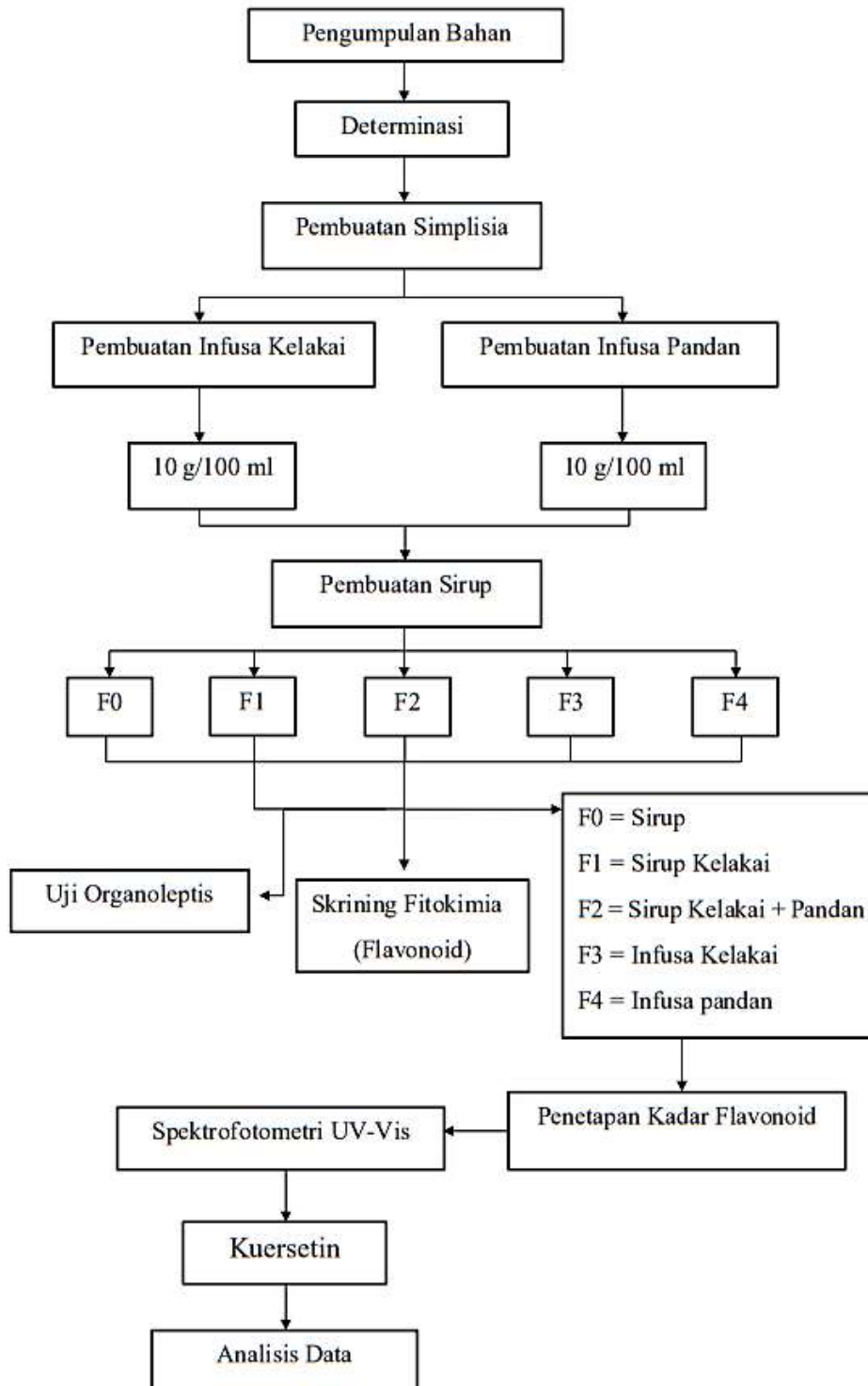
C: Konsentrasi Ekstrak

V: Volume

M: Berat ekstrak

Fp: Faktor Pengenceran

3.10 Alur Penelitian



Gambar 10. Alur Penelitian