

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu penelitian kualitatif dan kuantitatif secara eksperimental di laboratorium yang bertujuan untuk menghitung kadar flavonoid total ekstrak etanol 96% kulit batang tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Desember 2021 sampai dengan Juni 2022 dan tempat yang digunakan untuk melakukan penelitian ini adalah :

1. Laboratorium Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari Banjarbaru untuk melakukan proses ekstraksi kulit batang tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) dan identifikasi senyawa kimia dengan Kromatografi Lapis Tipis.
2. Laboratorium Kimia Farmasi STIKES Borneo Lestari Banjarbaru untuk menimbang bahan, membuat larutan, dan melakukan penetapan kadar flavonoid total ekstrak kulit batang tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) dengan spektrofotometer UV-Vis.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) yang diperoleh di daerah Barabai, Hulu Sungai Tengah, Kalimantan Selatan.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit batang yang diperoleh di daerah Barabai, Hulu Sungai Tengah, Kalimantan Selatan.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas: Konsentrasi ekstrak etanol 96% kulit batang tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.).

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat: Kadar flavonoid total ekstrak etanol 96% kulit batang tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.).

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat maserasi, aluminium foil (*Best Fresh*[®]), batang pengaduk, cawan penguap (*MM*[®]), gelas beker (*Pyrex*[®]), gelas ukur (*Pyrex*[®]), *hot plate*

(IKA[®]), kertas perkamen, kertas saring, kuvet (Hellma[®]), labu ukur (Pyrex[®]), lampu UV ($\lambda = 254$ nm dan $\lambda = 366$ nm), mikropipet (Dragon Lab[®]), neraca analitik (Ohaus[®]), Oven (Mettler UN55[®]), penangas air (Mettler[®]), pengayak, pipa kapiler, pipet tetes (One Lab[®]), rotary evaporator (IKRF10[®]), silika gel GF₂₅₄ (M[®]), spatula, spektrofotometer UV-Vis (T60[®]), stopwatch, tabung reaksi (pyrex[®]), vial, dan waterbath (Mettler[®]).

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.), aluminium (III) klorida (AlCl₃), amil alkohol (Merck[®]), aquadest (OneMed[®]), asam klorida (HCl) (Merck[®]), etanol 96% (Merck[®]), etanol p.a (Merck[®]), etil asetat (Bratachem[®]), kloroform (Merck[®]), kuersetin (Sigma aldrich[®]), natrium asetat (Merck[®]), dan serbuk magnesium (Merck[®]).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pengambilan Kulit Batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.)

Kulit batang tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) didapatkan dari Kandangan, Hulu Sungai Selatan. Kulit batang tandui diambil sekitar 1 m-1,5 m dari permukaan tanah dengan ketebalan $\pm 0,5$ cm-1 cm.

3.6.2 Determinasi Kulit Batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.)

Determinasi telah dilakukan sebelumnya oleh Indah (2021) di Laboratorium Dasar FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru.

3.6.3 Pembuatan Simplisia Kulit Batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.)

Disiapkan sampel kulit batang tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) yang telah dikumpulkan sebanyak 3 kg, yang telah disortir, dicuci, dirajang, dan dikeringkan. kemudian diayak menggunakan pengayak mesh No. 40, kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup rapat. kemudian sampel siap untuk diekstraksi. (Rachman, 2018).

$$\% \text{ Rendemen simplisia} = \frac{\text{Bobot simplisia (akhir)}}{\text{Bobot kulit batang (awal)}} \times 100\%$$

3.6.4 Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Kulit Batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.)

Ekstrak kulit batang tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) dibuat dengan metode maserasi. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 200 g, dimasukkan ke dalam wadah maserasi, lalu dimasukkan pelarut etanol 96% (1:10). Pada enam jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Kemudian disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh filtrat dan residunya. Residu penyaringan dilakukan remaserasi sebanyak

2 dengan prosedur dan perbandingan jumlah pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyaringan pertama kali. Kemudian ekstrak disaring kembali dengan kertas saring sehingga diperoleh filtrat dan residunya sehingga mendapatkan filtrat. Kemudian filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C untuk memisahkan senyawa dengan pelarut yang digunakan saat ekstraksi hingga mendapatkan ekstrak yang kental. Kemudian ekstrak kental diuapkan di atas *waterbath* pada suhu 40°C hingga mendapatkan bobot tetap. Hitung rendemen ekstrak dengan rumus :

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{Bobot Simplisia sebelum diekstraksi}} \times 100\%$$

(Saputri *et al.*, 2019; Ernawati & Nurliani, A. 2012; Sangadji *et al.*, 2018; Rachman, 2018).

3.6.5 Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Ekstrak Etanol 96% Kulit Batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) dengan Metode Skrining Fitokimia

0,5 g ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah *aquadest* 10 mL, dipanaskan sampai mendidih dan disaring dan dikocok kemudian ditambahkan serbuk magnesium dan diteteskan HCL pekat sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan 1 mL amil alkohol. Kemudian digojok kuat. Uji akan positif flavonoid jika

terbentuk warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Nugrahani *et al.*, 2016).

3.6.6 Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) dengan Kromatografi Lapis Tipis

Plat KLT yang digunakan yaitu plat *silica gel* GF₂₅₄ dengan ukuran 1,5 cm x 7,5 cm yang diberi tanda batas dengan jarak 1 cm pada bagian bawah dan 0,5 cm dari tepi atas plat. Plat dipanaskan terlebih dahulu dalam oven selama 15 menit dengan suhu 105°C. Kromatografi dilakukan di dalam bejana yang telah dijenuhkan dengan fase gerak. Pelarut organik yang digunakan sebagai fase gerak yaitu dengan perbandingan metanol : etil asetat : kloroform (Adiyani, 2014) dengan perbandingan terbaik yang telah dioptimasi. Penjenuhan fase gerak dapat dilakukan dengan menempatkan kertas saring ke dalam *chamber* (Nursafitri, 2020).

Ekstrak kulit batang tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) ditimbang sebanyak 50 mg lalu dimasukkan ke dalam gelas beker dan dilarutkan secukupnya dengan pelarut etanol 96%. Sampel diambil menggunakan pipa kapiler, kemudian ditotolkan pada plat KLT. Plat KLT dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi fase gerak yang telah dijenuhkan. Fase gerak dibiarkan terelusi hingga mencapai batas plat yang telah ditandai sebelumnya. Setelah selesai, plat KLT *silica gel* 60 GF₂₅₄ dikeluarkan dari *chamber*,

kemudian dikeringkan dan disemprot dengan AlCl_3 2%. Kemudian diamati bercak pada lampu UV 254 nm dan 366 nm. Hasil positif mengandung flavonoid menunjukkan warna kuning pada noda setelah disemprot AlCl_3 (Marliani *et al.*, 2016; Ahmad *et al.*, 2015). Kemudian hasil didokumentasikan dan dihitung nilai *Rf*. Jika nilai *Rf* besar berarti daya pisah zat yang dilakukan eluen minimum (Samosir *et al.*, 2018). Berikut ini rumus untuk menghitung *Rf* :

$$Rf = \frac{x \text{ (jarak yang ditempuh solute)}}{y \text{ (jarak yang ditempuh eluen sampai tanda batas)}}$$

3.6.7 Tahapan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 96%

Kulit Batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.)

a. Pembuatan Larutan Kuersetin

Dibuat larutan kuersetin 1000 ppm dengan cara ditimbang 25 mg kuersetin, kemudian dilarutkan dengan etanol pa hingga 25 mL. kemudian 1 mL larutan baku standar kuersetin dipipet dan dilarutkan dengan etanol pa hingga volumenya 10 mL agar didapat konsentrasi 100 ppm. Larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm dan 30 ppm. 1 mL dari 5 konsentrasi larutan tersebut dipipet dan masing-masing ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, natrium asetat 1 M 0,1 mL serta *aquadest* 2,8 mL (Pujiastuti & El'Zeba, 2021).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Larutan kuersetin di *running* pada *range* 400-800 nm. Hasil *running* tersebut akan menunjukkan panjang gelombang

maksimum standar baku kuersetin. Panjang gelombang yang diambil yaitu panjang gelombang dimana terjadi serapan maksimum (Pujiastuti & El'Zeba, 2021).

c. Penentuan *Operating Time* Kuersetin

Larutan kuersetin diambil sebanyak 1 mL. Larutan tersebut ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, natrium asetat 1 M 0,1 mL serta *aquadest* 2,8 mL. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang maksimum standar baku kuersetin. Absorbansi larutan dibaca interval 1 menit selama 0-60 menit sampai absorbansi yang stabil. *Operating time* ditentukan pada saat absorbansi yang stabil, tidak ada penurunan absorbansi (Pujiastuti & El'Zeba, 2021).

d. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan seri kadar kuersetin sebesar 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm. Seri kadar dari masing-masing diambil sebanyak ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, natrium asetat 1 M 0,1 mL serta *aquadest* 2,8 mL. didiamkan selama hasil *operating time* yang didapat dan dilakukan pembacaan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan (Pujiastuti & El'Zeba, 2021).

e. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 96% Kulit Batang Tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.)

Sampel ekstrak etanol 96% kulit batang tandui dengan konsentrasi 100 ppm masing-masing diambil sebanyak 2,5 mL, kemudian ditambahkan dengan 0,1 mL AlCl_3 10%, natrium asetat 1 M 0,1 mL serta *aquadest* 2,8 mL, dilakukan tiga kali refleksi. Sampel diinkubasi sesuai *operating time* pada suhu kamar. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang maksimal dari gelombang maksimum standar baku kuersetin (Pujiastuti & El'Zeba, 2021). Nilai pengukuran absorbansi dari ekstrak etanol 96% kulit batang tandui (*Mangifera rufocostata* Kosterm.) digunakan untuk menentukan kadar flavonoid total menurut Salmia (2016) dapat dihitung menggunakan rumus sebagai

$$F = \frac{C \times V \times F_p}{M}$$

Keterangan:

C = Konsentrasi Kuersetin

V = Volume ekstrak yang digunakan

M = Berat ekstrak

F_p = Faktor Pengenceran

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini diolah untuk analisis data secara deskriptif kuantitatif dengan metode kurva standar regresi linier $y = bx + a$ dibuat berdasarkan data luas area di bawah kurva dan konsentrasi (Pujiastuti & El'Zeba, 2021).