

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan pendekatan kualitatif uji skrining fitokimia dan kuantitatif penetapan kadar flavonoid total.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2022 - Mei 2023.

3.2.2 Tempat Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi dan Laboratorium Bahan Alam Universitas Borneo Lestari.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tanaman Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.) yang berada di daerah Astambul, Kabupaten Banjar.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel dari bahan tanaman yaitu daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.).

3.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel operasional pada penelitian ini yaitu :

1. Variabel bebas

Ekstrak etanol 96% dari daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.)

2. Variabel terikat

Kadar total flavonoid dari ekstrak etanol 96% daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.)

3. Variabel tergantung

Preparasi sampel

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Gunting, timbangan analitik, blender, ayakan mesh 40, bejana maserasi, *rotary evaporator*, *waterbath*, tabung reaksi, pipet tetes, mikropipet, gelas ukur, labu ukur, spektrofotometer UV-Vis, dan penggaris.

3.5.2 Bahan

Daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.), kain hitam, etanol 96%, magnesium, HCl pekat, NaOH, aquadest, HCl, pereaksi mayer, dragendrof, wagner, kloroform, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, FeCl₃, kuersetin, etanol p.a, dan AlCl₃.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Dilakukan determinasi pada tanaman daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.) yang dilaksanakan di Laboratorium dasar FMIPA

Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru. Hasil determinasi diperoleh bahwa sampel merupakan tumbuhan daun Bangkal dengan nama *Nauclea subdita* (Korth.) Steud.).

3.6.2 Pengolahan Simplisia

Pengambilan sampel daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.) dilakukan pada pagi hari sekitar pukul 10.00 WITA di daerah Astambul, Kabupaten Banjar. Kemudian sortasi basah untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada sampel, kemudian dilakukan pencucian dengan air mengalir dan tiriskan. Setelah itu, dilakukan perajangan menggunakan gunting menjadi beberapa bagian, selanjutnya dikeringkan dibawah sinar matahari langsung, pada pukul 08.00-10.00 WITA dengan ditutup kain hitam. Lakukan penjemuran sampai sampel kering, setelah kering dilakukan sortasi kering untuk memastikan tidak ada pengotor yang masih ada (Nurviana, 2016). Kemudian ditimbang dan dicatat berat keringnya lalu dijadikan serbuk menggunakan blender dan diayak dengan ayakan mesh 40, timbang kembali berat sampel serbuk yang diperoleh.

3.6.3 Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Sebanyak 250 g serbuk simplisia diekstraksi dengan etanol 96% (1:4). Sampel diaduk hingga semua permukaan mengenai pelarut. Ekstraksi dilakukan pada suhu kamar didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar. Ekstraksi dilakukan berulang kali (1 kali maserasi dan 2 kali remaserasi) sambil dilakukan pengadukan (Fadlilaturrahmah *et al.*, 2021). Hasil maserasi disaring dan Ekstrak cair dipisahkan dari pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator* dan selanjutnya dipekatkan menggunakan waterbath dengan suhu 70°C. Kemudian dihitung rendemennya.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang di dapat (g)}}{\text{Berat simplisia yang diekstraksi (g)}} \times 100\%$$

3.6.4 Skrining Fitokimia

Skrining Fitokimia yang dilakukan penelitian meliputi:

1. Uji Flavonoid

a. Uji *Wilstatter*

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol 96% daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.) kental dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 10 ml. Pengujian menggunakan pereaksi Shinoda, dengan sampel ditambahkan serbuk Magnesium 0,1 g dan 5 tetes larutan HCl pekat. Apabila terjadi perubahan warna menjadi jingga maka ekstrak positif mengandung flavonoid (Estikawati & Lindawati, 2019).

b. Uji NaOH 10%

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol 96% daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.) kental dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 10 ml. Sampel tersebut ditambahkan 5 tetes larutan NaOH 10%. Perubahan warna yang terjadi positif flavonoid apabila perubahan warna kuning sampai coklat (Theodora *et al.*, 2019).

c. Uji Bate-Smith

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol 96% daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.) kental dimasukkan dalam tabung reaksi. Sampel tersebut ditambahkan 5 tetes larutan HCl pekat. Sampel yang sudah tercampur dipanaskan 15 menit diatas penangas diamati perubahan warna dan jika berwarna merah maka positif flavonoid (Theodora *et al.*, 2019).

2. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol 96% daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.) kental dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan aquadest sebanyak 10 ml, dikocok vertikal selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 menit. Pembentukan busa setinggi 1-10 cm yang stabil, dan ditambahkan 1 tetes HCl 2N. Dinyatakan stabil apabila busa tetap stabil setelah penambahan HCl 2N (Alfilaili *et al.*, 2022).

3. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan 1 ml HCl 2 N dan 9 ml air, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, dinginkan dan saring. Fitrat dipindahkan masing-masing 3 tetes ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung 1 ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer, tabung 2 ditambahkan 2 tetes pereaksi dragendorf, dan tabung 3 ditambahkan 2 tetes pereaksi wagner. Jika terdapat alkaloid maka dengan pereaksi mayer terbentuk endapan putih atau kuning, dengan pereaksi dragendorf terbentuk endapan jingga, dan dengan pereaksi wagner terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam. Dikatakan mengandung alkaloid apabila 2 dari 3 pereaksi memberikan hasil positif (Puspa *et al.*, 2017).

4. Uji Steroid

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol 96% daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.) kental dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 10 ml. Sampel dilarutkan dengan 0,5 ml kloroform, 0,5 ml asam asetat anhidrat dan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Terbentuknya warna kebiruan menunjukkan adanya steroid (Fauzi *et al.*, 2007).

5. Uji Triterpenoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol 96% daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.) kental dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 10 ml. Sampel dilarutkan dengan 0,5 ml kloroform, 0,5 ml asam asetat anhidrat dan 2 ml asam

sulfat pekat melalui dinding tabung. Terbentuknya warna kecoklatan atau ungu pada pembatas larutan menunjukkan positif triterpenoid (Fauzi *et al.*, 2007).

6. Uji Tanin

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol 96% daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth.) Steud.) kental dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 10 ml. Sampel direaksikan dengan 1 ml FeCl₃ 10%. Apabila terjadi perubahan warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin (Anggraeni *et al.*, 2018).

3.7 Penentuan Kadar Flavonoid Total

3.7.1 Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Kuersetin ditimbang dengan neraca analitik sebanyak 0,01 g, lalu dilarutkan dengan larutan etanol p.a dalam labu ukur 10 ml hingga tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/ml (Nur Handayani *et al.*, 2018).

3.7.2 Penentuan Panjang Gelombang

Larutan kuersetin 1000 µg/ml kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 100 µg/ml. Sebanyak 1 ml larutan kuersetin 100 µg/ml dipipet kemudian ditambahkan 1 ml AlCl₃ 2% dan 8 ml asam asetat 5%. Kemudian diinkubasi selama 15-60 menit, dan dilakukan pembacaan panjang gelombang pada rentang 400-500. Panjang gelombang yang menunjukkan nilai serapan tinggi merupakan panjang gelombang maksimum (Ipandi *et al.*, 2016)

3.7.3 Penentuan *Operating Time*

Larutan kuersetin 100 $\mu\text{g/ml}$ diambil sebanyak 1 ml lalu ditambahkan 1 ml AlCl_3 2% dan 8 ml asam asetat 5%. Kemudian diukur absorbansi larutan tersebut pada panjang gelombang yang diperoleh dengan interval waktu 2 menit yang dimulai dari 0 menit sampai 60 menit hingga didapatkan nilai absorbansi yang stabil (Bakti *et al.*, 2017).

3.7.4 Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan baku 100 $\mu\text{g/ml}$ kuersetin dibuat dalam 10 ml dengan variasi konsentrasi 40, 60, 80, 100, dan 120 $\mu\text{g/ml}$. Sebanyak 1 ml larutan dari berbagai konsentrasi direaksikan dengan 1 ml AlCl_3 2%, ditambahkan 8 ml asam asetat 5% ke dalam larutan, kemudian diinkubasi selama *operating time*, absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ maksimum kuersetin, dibuat kurva kalibrasi dengan menghubungkan nilai serapan sebagai koordinat (Y) dan konsentrasi larutan standar absis (X) (Ipandi *et al.*, 2016).

3.7.5 Penetapan Kadar Flavonoid Total Daun Bangkal

Ekstrak Etanol 96% Daun Bangkal diambil sebanyak 0,015 g dan dilarutkan dengan 10 ml etanol p.a. Kemudian diaduk sampai homogen dan diperoleh 1500 $\mu\text{g/ml}$. Sampel di pipet 1 ml, kemudian ditambahkan 1 ml AlCl_3 2% dan 8 ml asam asetat 5%. Setelah itu diinkubasi selama *operating time*, absorbansi diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum, dan dilakukan 3x replikasi. Setelah

diperoleh absorbansi ekstrak etanol 96% daun Bangkal, dihitung kadar flavonoid total (Azizah et al., 2014a).

$$F = \frac{c \cdot V}{m} = \dots\dots\dots(mgQE/g \text{ ekstrak})$$

Keterangan

F : Jumlah Flavonoid

c : Kesetaraan Kuersetin (mg/ml)

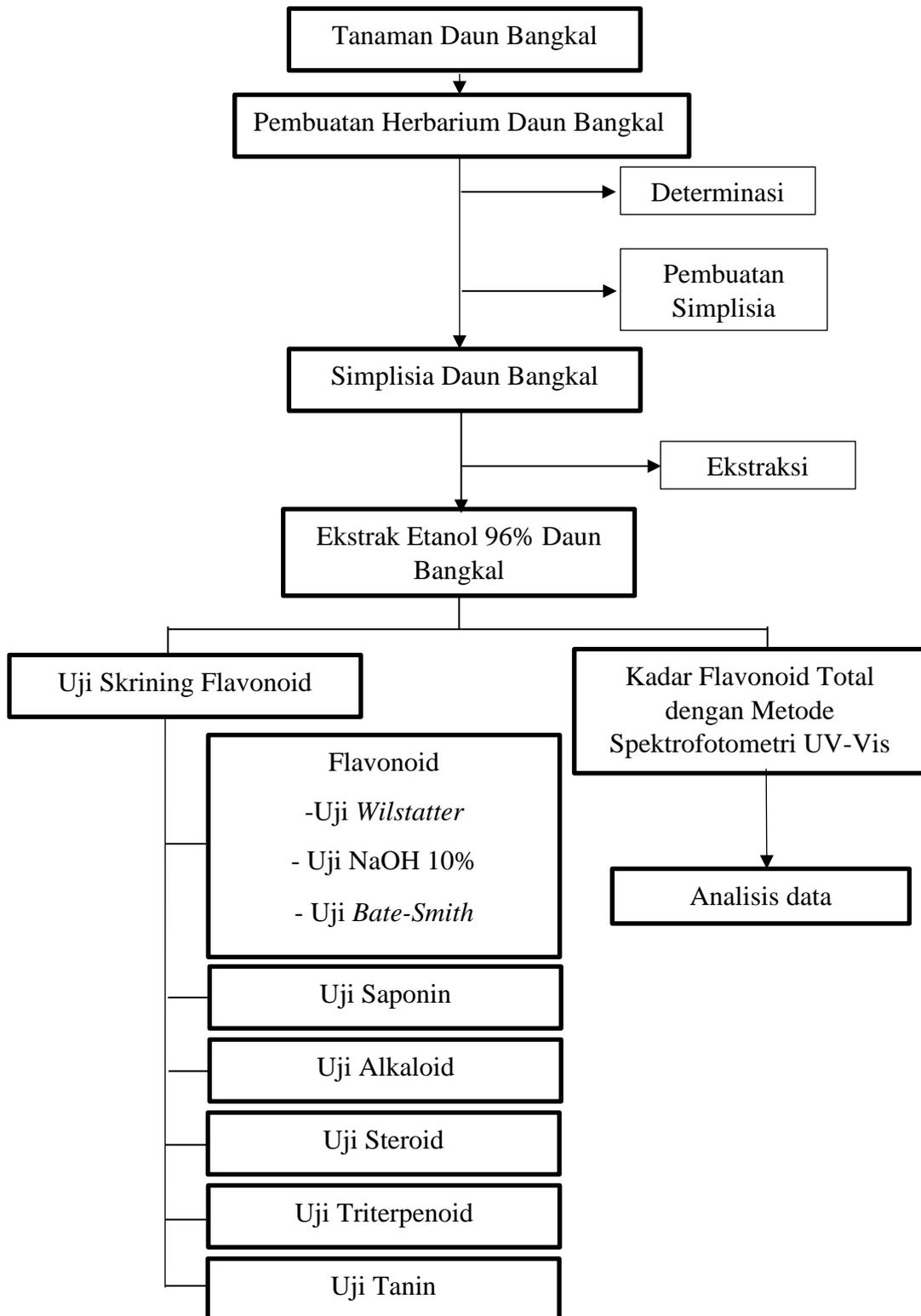
V : Volume Total Ekstrak (ml)

m : Berat Sampel (g)

3.8 Analisis Data

Analisis kadar flavonoid total menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Standar yang digunakan adalah kuersetin. Pengukuran Panjang gelombang maksimum dilakukan pada rentang Panjang gelombang 400-500 nm yang digunakan untuk menentukan kurva seri kuersetin dan kadar flavonoid total pada sampel ekstrak etanol 96% daun Bangkal. Pada penentuan kurva baku kuersetin, dibuat kuersetin dengan seri konsentrasi 40, 60, 80, 100, dan 120 $\mu\text{g/ml}$. Hasil yang didapat dari pembuatan kurva kalibrasi adalah persamaan regresi linier $y = bx + a$. Penetapan kadar flavonoid total dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva baku kuersetin.

3.9 Skema Kerja Penelitian



Gambar 9. Skema Kerja Penelitian