

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif kualitatif dan kuantitatif melalui pendekatan di laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui hasil penetapan kadar total fenol dan flavonoid ekstrak etil asetat daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Borneo Lestari Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi yang diambil dari penelitian ini adalah daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) yang tumbuh di Kabupaten Banjar.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan untuk penelitian ini yaitu daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) yang diperoleh di Martapura, Kabupaten Banjar, Provinsi Kalimantan Selatan.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini yang termasuk variabel bebas adalah ekstrak etil asetat daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.)

3.4.2 Variabel Terikat

Pada penelitian ini yang termasuk variabel terikat adalah nilai kadar total flavonoid dan fenol ekstrak etil asetat daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.)

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, kertas saring, alat soklet, alumunium foil (*Klin Pak*®), pengayak (*Standar Sleves*®), gelas beker (*Pyrex*®), batang pengaduk, vial, *waterbath* (*Memmeri*®), corong kaca (*Pyrex*®), *rotatory evaporator* (*IKFR 10*®), neraca analitik (*Fujitso*®), cawan penguap, gelas ukur (*Pyrex*®), pipet tetes, pipet ukur (*Iwaki*®), pipet volume (*Iwaki*®), mikropipet (*Dragon Lab*®), labu ukur (*Pyrex*®), tabung reaksi (*Pyrex*®), kuvet (*Quartz Cuvette*®), vortex (*Blonex*®), *stopwatch*, dan Spektrofotometer UV–Vis.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.), etil asetat, metanol p.a (*Merck*®), aquadest, amil alkohol (*Merck*®), asam galat (*Merck*®), asam asetat

glasial (CH_3COOH) (*Merck*®), besi (III) klorida (FeCl_3) (*Merck*®), HCl Pekat (*Merck*®), magnesium (*Merck*®), kuersetin (*Merck*®), aluminium klorida (AlCl_3) (*Merck*®), natrium karbonat (Na_2CO_3) (*Merck*®), dan reagen *Folin Ciocalteu* (*Merck*®).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pengambilan Daun Rambutan

Pengambilan daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) varietas Antalagi, di peroleh dari daerah Martapura, Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan. Bagian tanaman yang diambil adalah daun yang utuh dan berwarna hijau muda yang terletak di dekat pucuk atau di ranting muda dari tanaman Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) (Lestari & Juwitaningtyas, 2023).

3.6.2 Determinasi Tumbuhan Rambutan

Determinasi Daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) dilakukan di Laboratorium FMIPA Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru. Determinasi dilakukan untuk mencari tahu kebenaran identitas dari suatu tanaman untuk menghindari kesalahan saat mengumpulkan bahan atau sampel.

3.6.3 Pembuatan Simplisia Daun Rambutan

Sebanyak 2 Kg daun rambutan yang dipilih kemudian disortasi basah agar kotoran atau benda asing dari simplisia serta bagian yang tidak digunakan terpisah dari simplisia. Setelah itu, dilakukan pencucian

dengan air bersih yang mengalir. Setelah dilakukan pencucian, kemudian dipotong kecil-kecil yang dimaksudkan untuk membantu mempercepat proses pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan diangin-anginkan, di tempat bebas dari cahaya matahari secara langsung pada suhu $\pm 27^{\circ}\text{C}$ (Lestari & Juwitaningtyas, 2023). Daun yang sudah kering kemudian disortasi kering untuk memastikan bahwa simplisia benar-benar bebas dari bahan asing. Kemudian hasil simplisia dihaluskan menggunakan blender, diayak hingga halus dengan pengayakan mesh 40. Hitung rendemen yang diperoleh berdasarkan % bobot (b/b) antara ekstrak yang dihasilkan dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan (Widodo & Subositi, 2021).

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

3.6.4 Pembuatan Ekstrak Daun Rambutan

Penimbangan sebanyak 60 gram serbuk daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.), lalu bungkus dalam kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam soklet, ditambahkan sebanyak 420 mL pelarut etil asetat yang selanjutnya dipanaskan pada suhu 50°C hingga ekstrak bening atau tidak berwarna. Selanjutnya ekstrak disaring dan filtratnya dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C (Susanty & Bachmid, 2019; Vinca, 2023). Proses dilanjutkan pada tahap penguapan ekstrak menggunakan *waterbath* pada suhu 50°C sampai ekstrak kering dan didapatkan bobot tetap. Penyimpanan ekstrak dilakukan pada penyimpanan khusus agar kelembapan dan suhu atau

perlindungan terhadap cahaya dapat dikontrol dengan baik. Ekstrak yang diperoleh akan dihitung rendemen ekstraknya. Rendemen ekstrak merupakan berat hasil ekstraksi yang dihasilkan dibagi dengan berat bahan baku awal, kemudian dikalikan 100% (Syamsul *et al.*, 2020).

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

3.6.5 Skrining Fitokimia

a. Uji Senyawa Fenol

Pembuatan larutan sampel adalah dengan cara melarutkan 0,1 gram ekstrak etil asetat dengan pelarut etanol, juga penambahan larutan FeCl_3 1 % sebanyak 2 tetes. Jika hasil yang diperoleh berwarna hijau atau biru kehitaman, maka sampel positif mengandung senyawa fenolik (Ramadhan *et al.*, 2021).

b. Uji Senyawa Flavonoid

Pembuatan larutan sampel adalah dengan melarutkan 0,1 gram ekstrak etil asetat dengan pelarut etanol, dan ditambahkan 2 mg serbuk magnesium, juga 1 mL HCl pekat, yang kemudian ditambahkan dengan 2 mL amil alkohol. Jika warna pada lapisan amil alkohol menjadi merah, jingga atau kuning, maka sampel positif mengandung flavonoid (Ramadhan *et al.*, 2021).

3.6.6 Pengukuran Kadar Fenol Total

a. Pembuatan Larutan Induk Asam Galat

Asam galat terlebih dahulu ditimbang dalam jumlah 10 mg kemudian dimasukkan pada labu ukur ukuran 10 mL, dan tambahkan metanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi larutan induk yakni 1000 ppm (Rahman *et al.*, 2021).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Larutan asam galat dalam konsentrasi 50 ppm diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 0,5 mL, ditambahkan reagen *Folin-Ciocalteau* sebanyak 5 mL. (dengan perbandingan 1:10 aquadest) dan diamkan selama 5 menit, kemudian ditambahkan 4 mL Na_2CO_3 1M campur sampai homogen, diamkan menggunakan suhu kamar dan jauhkan dari cahaya selama *operating time*. Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang berkisar antara 400-800 nm (Ramadhan & Forestryana, 2021; Rumoroy *et al.*, 2019; Sayakti *et al.*, 2023).

c. Penentuan *Operating Time*

Larutan asam galat konsentrasi 50 ppm diambil menggunakan mikropipet sebanyak 0,5 mL, setelah itu tambahkan reagen *Folin-Ciocalteau* sebanyak 5 mL (dengan perbandingan 1:10 aquadest), diamkan 5 menit, lalu tambahkan dengan 4 mL Na_2CO_3 1M. Campurkan semua bahan sampai homogen dan absorbansinya diukur

setiap 2 menit dengan rentang waktu 0-90 menit sesuai dengan panjang gelombang yang diperoleh (Ramadhan & Forestryana, 2021).

d. Pembuatan Kurva Baku Asam Galat

Larutan induk dalam konsentrasi 1000 ppm masing-masing dipipet dan dimasukkan sebanyak 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 dan 0,7 mL dalam labu ukur yang berukuran 10 mL, setelah itu tambahkan metanol p.a hingga tanda batas, sehingga terbentuk larutan asam galat konsentrasi 30, 40, 50, 60 dan 70 ppm (Vinca, 2023).

Seri konsentrasi tersebut tersebut kemudian dipipet 0,5 mL dan dimasukkan kedalam vial yang kemudian dilanjutkan dengan penambahan 5 mL reagen *Folin-Ciocalteu* (dengan perbandingan 1:10 aquadest) diamkan selama 5 menit, lanjutkan dengan penambahan Na_2CO_3 1 M sebanyak 4 mL pada masing-masing larutan, campur sampai homogen, lalu didiamkan selama *operating time* pada suhu kamar dan dalam kondisi gelap. Pembacaan seri kadar pada panjang gelombang maksimum yang dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui hasil yang didapat (Ramadhan & Forestryana, 2021; Sayakti *et al.*, 2023).

e. Penetapan Kadar Total Fenol Ekstrak Etil Asetat Daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.)

Ekstrak terlebih dahulu ditimbang 10 mg barulah kemudian dilarutkan dengan metanol p.a menggunakan labu ukur yang berukuran 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan 1000 ppm dipipet 1 mL, kemudian dilanjutkan dengan penambahan

metanol p.a pada labu ukur 10 mL diperoleh konsentrasi 100 ppm. Larutan konsentrasi 100 ppm dipipet sebanyak 0,5 mL, dilanjutkan dengan penambahan 5 mL reagen *folin-Ciocalteu* (perbandingan dengan aquadest 1:10), kemudian 4 mL larutan Na_2CO_3 1 M juga ditambahkan ke dalam vial, digojok sampai homogen, setelah itu diidamkan sesuai dengan rentang waktu *operating time* dan dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang didapat (Ramadhan & Forestryana, 2021; Sayakti *et al.*, 2023; Ulya, 2020).

3.6.7 Pengukuran Kadar Flavonoid Total

a. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Kuersetin terlebih dahulu ditimbang dalam jumlah 10 mg, dilarutkan dengan menggunakan pelarut metanol p.a ad 10 mL pada labu ukur 10 mL, sehingga diperoleh hasil konsentrasi larutan induk 1000 ppm. Larutan induk 1000 ppm dipipet sebanyak 1 mL, ditambahkan metanol p.a 10 mL pada labu ukur 10 mL ad sampai tanda batas agar terbentuk konsentrasi 100 ppm (Muthia *et al.*, 2023).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan kuersetin dalam konsentrasi 100 ppm diambil dengan mikropipet sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%, lalu diinkubasi selama *operating time*. Pembacaan absorbansi dengan Spektrofotometer UV-Vis dengan

panjang gelombang berkisar antara 400-450 nm (Muthia *et al.*, 2023; Yuliani *et al.*, 2022).

c. Penentuan *Operating Time*

Larutan kuersetin pada konsentrasi 100 ppm diambil dengan mikropipet sebanyak 1 mL, lalu ditambahkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Campur sampai homogen dan absorbansinya diukur setiap 2 menit dengan kurun waktu 0-60 menit pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan (Muthia *et al.*, 2023; Rahmati *et al.*, 2020).

d. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Larutan induk 1000 ppm masing-masing dipipet dan dimasukkan dalam jumlah 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 dan 0,6 mL kedalam labu ukur 10 mL, setelah itu tambahkan dengan pelarut metanol p.a hingga tanda batas, sehingga terbentuk larutan kuersetin konsentrasi 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm (Rahmati *et al.*, 2020).

Seri konsentrasi tersebut kemudian dipipet 1 mL dan dimasukkan kedalam vial, kemudian ditambahkan dengan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml asam asetat 5%, diamkan dalam kurun waktu *operating time*. Pembacaan seri kadar pada panjang gelombang yang didapat dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada untuk mengetahui hasil yang didapat (Muthia *et al.*, 2023; Rahmati *et al.*, 2020; Ramadhan *et al.*, 2021; Rawar *et al.*, 2022; Yulianti *et al.*, 2020).

e. Penetapan Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etil Asetat Daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.)

Ekstrak terlebih dahulu ditimbang dalam jumlah 10 mg dilarutkan dengan pelarut metanol p.a pada labu ukur 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi yakni 1000 ppm. Larutan tersebut diambil sebanyak 1 mL ditambah dengan 1 mL AlCl₃ 10% dan ditambahkan 8 ml asam asetat 5%. Larutan tersebut didiamkan dalam waktu 30 menit dan kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan (Muthia *et al.*, 2023; Rahmati *et al.*, 2020).

3.7 Analisis Data

Data masing-masing kadar absorbansi fenol dan flavonoid yang diperoleh, dianalisis menggunakan persamaan regresi linier $y = bx + a$ (Rantung *et al.*, 2021). Kadar total fenolik (mg GAE/g). Kadar total flavonoid (mg QE/g) (Ramadhan *et al.*, 2021). Kadar total fenol/flavonoid dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Kadar total fenol/flavonoid} = \frac{C \times V \times fp}{M}$$

Keterangan:

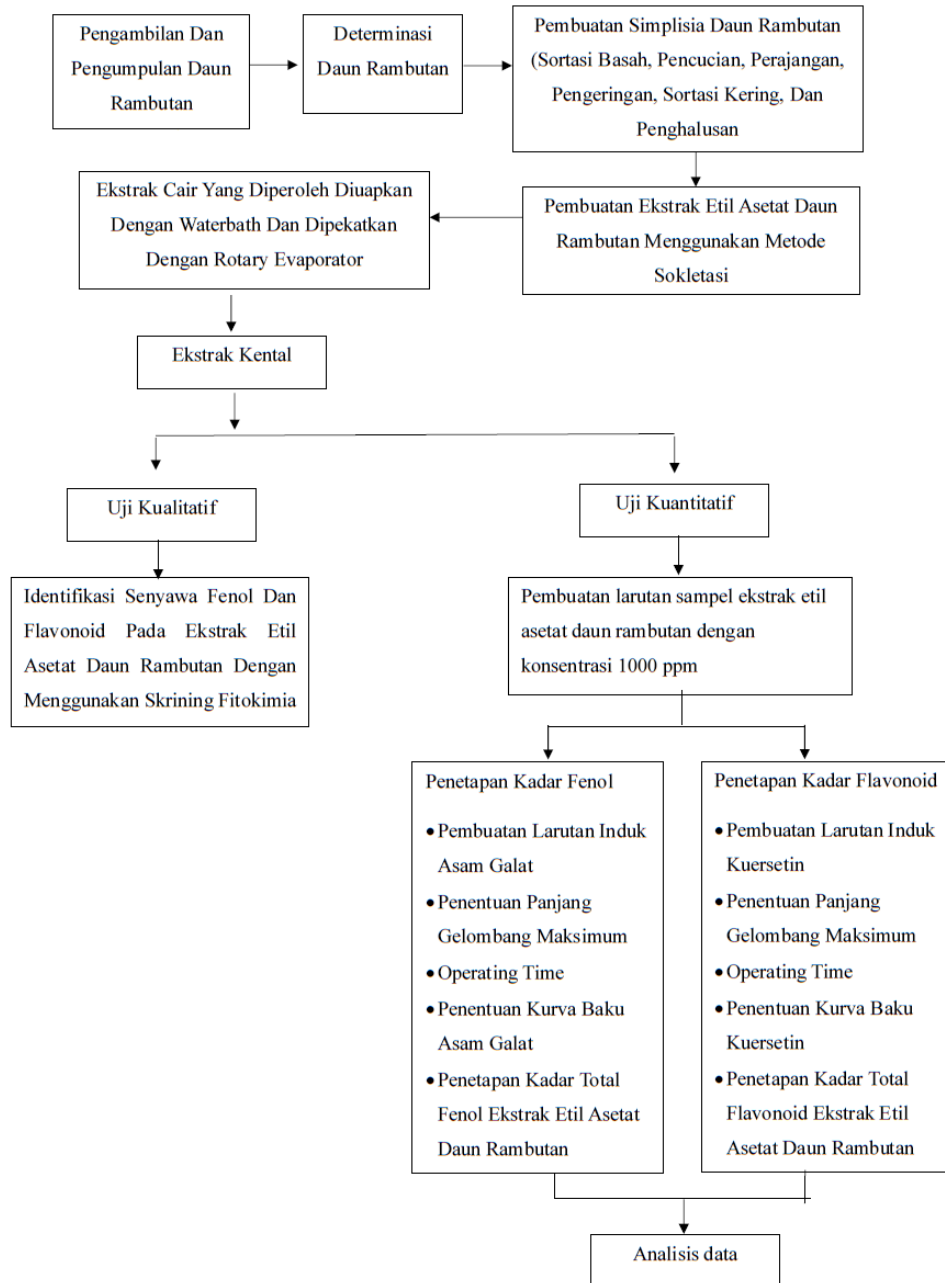
C : Konsentrasi asam galat/kuersetin (mg/L)

V : Volume total ekstrak (mL)

M : Berat sampel (mg)

Fp : Faktor Pengenceran

3.8 Alur Penelitian



Gambar 9. Alur Penelitian