

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif observasional, yaitu secara kualitatif menggunakan skrining fitokimia dan secara kuantitatif menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk menentukan kandungan fenol serta flavonoid ekstrak etanol 70% daun kasturi yang dihasilkan melalui proses sokletasi.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian diadakan antara Februari hingga Mei 2024 di Laboratorium Bahan Alam serta Laboratorium Kimia Universitas Borneo Lestari Banjarbaru.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Pohon kasturi diperoleh dari Kecamatan Astambul, Kabupaten Banjar, Provinsi Kalimantan Selatan Selatan.

3.3.2. Sampel

Sampel daun kasturi diperoleh dari Kecamatan Astambul, Kabupaten Banjar, Provinsi Kalimantan Selatan, yaitu bagian daun hijau yang sudah matang dan masih ada dipohon (daun keempat dari pucuk sampai daun kelima dari pangkal).

3.4. Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1. Variabel Bebas

Ekstrak etanol 70% daun kasturi yang dihasilkan melalui sokletasi merupakan variabel bebas dalam penelitian ini.

3.4.2. Variabel Terikat

Kadar fenol dan flavonoid dalam ekstrak etanol 70% daun kasturi yang dihasilkan melalui sokletasi dan dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis merupakan variabel terikat pada penelitian ini.

3.4.3. Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol 70% daun kasturi merupakan ekstrak yang didapatkan dari simplisia dan etanol 70% yang diekstraksi dengan sokletasi.
- b. Total fenol dalam sampel ditetapkan sebagai ekuivalen asam galat (GAE), yang menunjukkan hasil fenol. Sedangkan total flavonoid dalam sampel ditetapkan sebagai ekuivalen kuersetin (QE), yang menunjukkan hasil flavonoid. Kadar total fenol dan flavonoid yang diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis menghasilkan nilai yang dihitung menggunakan rumus fenol dan flavonoid total.
- c. Penggunaan spektrofotometri UV-Vis ditujukan untuk meneliti bagaimana cahaya dalam spektrum ultraviolet dan tampak diserap pada berbagai panjang gelombang. Metode ini menggunakan alat yang mengukur absorbansi pada spektrum tersebut, sehingga dapat menentukan tingkat absorbansi pada panjang gelombang berbeda.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Alat/Instrument dan Bahan Penelitian

a. Alat

Penelitian ini menggunakan alat-alat seperti, batang pengaduk, batu didih, cawan penguap, gelas beker (*Pyrex*®), kuvet, labu alas bulat (*Pyrex*®), labu ukur (*Pyrex*®), mikropipet (*Dragon Lab*®), neraca analitik (*Scout Pro*®), penangas air, perangkat alat ekstraksi sokletasi, pipet volume, pipet tetes, *rotary evaporator* (*IKFR 10*®), spektrofotometer UV-Vis (*T60C*), *stopwatch*, tabung reaksi, termometer, *waterbath* (*Memmert*®) dan alat pendukung lainnya.

b. Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan-bahan seperti, serbuk simplisia daun kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm), amil alkohol (*Emsure*®), asam asetat (*Merck*®), asam galat (*Merck*®), aquadest (*OneMed*®), etanol 70%, FeCl_3 (*Arkitos*®), HCl pekat (*Merck*®), kuersetin (*Sigma aldrich*®), metanol p.a (*Emsure*®), Na_2CO_3 (*Emsure*®), pereaksi AlCl_3 , pereaksi *Folin-Ciocalteu* dan serbuk Mg (*Merck*®).

3.5.2. Jalan/Alur Penelitian

a. Pengambilan Bahan

Daun kasturi dalam penelitian ini diperoleh dari Kecamatan Astambul, Kabupaten Banjar, Provinsi Kalimantan Selatan. Kriteria

daun yang digunakan yaitu berwarna hijau yang sudah matang dan masih ada di pohonnya (daun keempat dari pucuk sampai daun kelima dari pangkal).

b. Determinasi Tumbuhan Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm)

Sebelum dilakukannya penelitian ini, proses penentuan tumbuhan kasturi terlebih dahulu dilakukan. Determinasi dilakukan di Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru. Tujuan dilakukannya determinasi agar tumbuhan yang akan diteliti dapat diketahui kebenarannya dan kesalahan dalam pengambilan bahan penelitian dapat dihindari dengan cara menentukan nama serta jenis tumbuhan secara spesifik dan akurat (Lestari *et al*, 2021).

c. Pembuatan Simplisia Daun Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm)

Daun segar yang diambil pada penelitian ini sebanyak 1,5 kg. Pada proses pemetikan daun kasturi dilakukan pada pagi hari dengan memilih daun yang segar, tidak rusak, robek, layu dan busuk. Sampel daun segar yang sudah diambil dan dikumpulkan, dilakukan sortasi basah agar benda asing atau kotoran dari simplisia dapat dipisahkan. Selanjutnya, dilakukan pencucian pada simplisia menggunakan air mengalir untuk menghilangkan benda asing atau kotoran yang menempel. Daun kasturi kemudian dirajang dan diangin-anginkan sebagai proses pengeringan. Setelah daun mengering, dilanjutkan proses sortasi kering agar pengotor dapat

dipisahkan. Setelah itu, simplisia dihaluskan dan diayak menggunakan pengayak mesh 40 (Alista, 2023; Nafarin, 2018).

Rumus rendemen simplisia sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Simplisia (BS)}}{\text{Bobot Bahan Baku (BK)}} \times 100\%$$

d. Pembuatan Ekstrak Daun Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm)

Metode ekstraksi sokletasi pada penelitian ini dilakukan menggunakan perbandingan 1:5 antara serbuk dengan pelarut. Serbuk simplisia daun kasturi ditimbang sebanyak 50 g. Setelah serbuk simplisia dibungkus menggunakan kertas saring dan diikat menggunakan tali, diletakkan kedalam alat soklet yang telah dirakit. Tambahkan sebanyak 250 mL etanol 70% kedalam labu alas bulat dan lakukan sokletasi pada suhu 60⁰-70⁰C hingga warna tetesan siklus memudar atau hilang seluruhnya. Ekstrak cair yang dihasilkan selanjutnya dipekatkan pada suhu 50⁰C menggunakan alat *rotary evaporator*. Setelah itu, pemekatan ekstrak dilakukan kembali menggunakan *waterbath* dengan suhu <70% sehingga tercapainya bobot tetap (Alista, 2023; Ulya, 2020). Rumus rendemen ekstrak sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak (BE)}}{\text{Bobot Simplisia (BS)}} \times 100\%$$

e. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Daun Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm)

Senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etanol 70% daun kasturi hasil sokletasi dapat diidentifikasi menggunakan skrining fitokimia (Lestari *et al*, 2021).

1. Fenol

Sebanyak 0,1 g sampel ekstrak dicampurkan bersama 10 mL aquadest kemudian diberi FeCl₃ 5% beberapa tetes. Hasil positif apabila berwarna hijau biru kehitaman (Muhammad *et al*, 2021; Nugrahani *et al*, 2016; Rahmatika, 2022).

2. Flavonoid

Sebanyak 0,1 g sampel ekstrak dicampurkan bersama 10 mL aquadest, kemudian dipanaskan kurang lebih 5 menit hingga mendidih. Setelah proses tersebut, dilakukan penyaringan, kemudian filtrat yang diperoleh diambil dan dicampurkan dengan 0,1 g serbuk Mg serta 1 mL amil alkohol dan HCl pekat. Digojog kemudian dibiarkan terpisah. Hasil yang dinyatakan positif apabila larutan yang terbentuk berwarna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Muhammad *et al*, 2021; Nugrahani *et al*, 2016; Rahmatika, 2022).

f. Penetapan Kadar Fenol Total

1. Pembuatan Larutan Induk Asam Galat (500 ppm)

Sebanyak 50 mg asam galat dilarutkan bersama metanol p.a dalam labu ukur berukuran 100 mL, kemudian dicukupkan

pelarut sampai tanda batas (Andriani & Murtisiwi, 2018; Rahmatika, 2022).

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Larutan asam galat dengan konsentrasi 50 ppm diambil sebesar 0,5 mL, lalu dicampurkan reagen *Folin-Ciocalteu* sebesar 5 mL yang sebelumnya dilarutkan menggunakan aquadest dengan perbandingan 1:10. Lalu digojog dan diamkan kurang lebih 5 menit. Setelah itu masukkan larutan Na_2CO_3 1 M sebesar 4 mL. Larutan tersebut kemudian diinkubasi selama 55 menit dan absorbansinya diukur pada panjang gelombang 400-800 nm (Soraya, 2022; Kurnia *et al*, 2020).

3. Penentuan *Operating Time* Asam Galat

Larutan asam galat konsentrasi 50 ppm diambil sebesar 0,5 mL, kemudian ditambahkan reagen *Folin-Ciocalteu* sebesar 5 mL yang sebelumnya dilarutkan dengan aquadest menggunakan perbandingan 1:10. Lalu digojog dan diamkan kurang lebih 5 menit. Setelah itu, ditambahkan larutan Na_2CO_3 1 M sebesar 4 mL. Tentukan absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang didapat setiap 2 menit dan lakukan pengukuran selama 60 menit hingga absorbansi mencapai kondisi stabil. Hasil tersebut yang akan digunakan sebagai *Operating Time* (Soraya, 2022; Sari & Noverda, 2017).

4. Penentuan Standar Kurva Baku Asam Galat

Baku standar yang dibuat dengan menggunakan asam galat sebanyak 5 konsentrasi yaitu 30, 40, 50, 60 dan 70 ppm dari larutan induk asam galat 500 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan kadar dimasukkan kedalam masing-masing tabung sebesar 0,5 mL. Selanjutnya dicampurkan dengan reagen *Folin-Ciocalteu* sebesar 5 mL yang sebelumnya dilarutkan menggunakan aquadest dengan perbandingan 1:10. Kemudian digojog dan diamkan kurang lebih 5 menit. Lalu ditambahkan sebesar 4 mL larutan Na_2CO_3 1 M disetiap tabung, digojog hingga homogen dan diamkan sesuai suhu kamar selama *Operating Time*. Semua larutan diukur absorbansinya sesuai panjang gelombang maksimum yang didapat (Soraya, 2022; Kurnia *et al*, 2020).

5. Penetapan Kadar Fenol Total Ekstrak Etanol 70% Daun Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm) Hasil Sokletasi

Ekstrak sampel sebanyak 50 mg dilarutkan bersama etanol 70% dan metanol p.a sebesar 50 mL hingga didapat konsentrasi 1000 ppm. Kemudian, sebanyak 0,5 mL larutan ekstrak dicampurkan reagen *Folin-Ciocalteu* sebanyak 5 mL yang sebelumnya dilarutkan menggunakan aquadest dengan perbandingan 1:10. Kemudian digojog dan diamkan kurang lebih 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan larutan Na_2CO_3 1 M sebesar 4 mL dan diamkan sesuai suhu kamar selama *Operating Time*.

Absorbansi larutan ekstrak diukur dengan alat Spektrofotometer UV-Vis menggunakan panjang gelombang maksimum yang didapat dengan melakukan pengulangan atau replikasi sebanyak 3 kali untuk memperoleh ketepatan dan keakuratan data (Soraya, 2022; Kurnia *et al*, 2020; Wahdaningsih *et al*, 2017).

g. Penetapan Kadar Flavonoid Total

1. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Kuersetin sebanyak 100 mg dilarutkan bersama metanol p.a dalam labu ukur ukuran 100 mL, kemudian dicukupkan pelarut hingga tanda batas (Dewi *et al*, 2014 ; Rahmatika, 2022).

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Larutan kuersetin konsentrasi 50 ppm diambil sebesar 1 mL, lalu dicampurkan $AlCl_3$ 10% sebesar 1 mL dan asam asetat 5% sebesar 8 ml. Kemudian digojog dan diamkan kurang lebih 30 menit. Setelah itu, absorbansi diukur pada panjang gelombang 350-450 nm (Putri *et al*, 2023; Rahmatika, 2022).

3. Penentuan *Operating Time* Kuersetin

Larutan kuersetin konsentrasi 50 ppm diambil sebesar 1 mL, kemudian ditambahkan dengan $AlCl_3$ 10% sebesar 1 mL dan asam asetat 5% sebesar 8 ml. Setelah itu digojog dan ditentukan absorbansi pada panjang gelombang yang didapat setiap 2 menit dan lakukan pengukuran selama 60 menit hingga absorbansi mencapai kondisi stabil (Asmorowati & Lindawati, 2019).

4. Penentuan Standar Kurva Baku Kuersetin

Baku standar yang dibuat dengan menggunakan kuersetin sebanyak 5 konsentrasi yaitu 30, 40, 50, 60 dan 70 ppm dari larutan induk kuerstin 1000 ppm. Masing-masing konsentrasi dari larutan kadar dimasukkan kedalam masing-masing vial gelap sebesar 1 mL. Selanjutnya ditambahkan dengan AlCl_3 10% sebesar 1 mL dan asam asetat 5% sebesar 8 mL disetiap vial, digojog hingga homogen dan diamkan selama *Operating Time*. Absorbansi semua larutan diukur dengan panjang gelombang maksimum yang didapat (Bakti *et al*, 2017; Rahmatika, 2022).

5. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 70% Daun Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm) Hasil Sokletasi

Ekstrak sampel sebesar 50 mg dilarutkan bersama etanol 70% dan metanol p.a 50 mL hingga didapat konsentrasi 1000 ppm. Kemudian, larutan ekstrak sebesar 1 mL dicampurkan dengan AlCl_3 10% sebesar 1 mL dan asam asetat 5% sebesar 8 mL. Kemudian dogojog dan diamkan sesuai suhu kamar selama *Operating Time*. Absorbansi larutan ekstrak diukur dengan alat Spektrofotometer UV-Vis menggunakan panjang gelombang maksimum yang didapat dengan melakukan pengulangan atau replikasi sebanyak 3 kali untuk memperoleh ketepatan dan keakuratan data (Bakti *et al*, 2017; Rahmatika, 2022; Wahdaningsih *et al*, 2017).

3.6. Analisis Data

3.6.1. Kadar Fenol Total

Data primer terdiri dari nilai absorbansi larutan asam galat yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi dan persamaan regresi linear. Jumlah total fenol dihitung menggunakan perolehan dari kurva kalibrasi standar yaitu persamaan regresi linear $y = bx + a$. Hasil dari perhitungan ini dinyatakan dalam satuan mg GAE/g ekstrak (Salmia, 2016; Rahmatika, 2022). Rumus Perhitungan kadar total fenol menurut Salmia (2016) adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

C = Merupakan konsentrasi asam galat yang diukur dalam (mg/L)

V = Merupakan total volume etanol yang dinyatakan dalam (ml)

fp = Merupakan faktor yang digunakan untuk pengenceran

M = Menunjukkan pada berat sampel dalam satuan (mg)

3.6.2. Kadar Flavonoid Total

Persamaan kurva baku dibuat dari deret konsentrasi baku kuersetin. Perhitungan kadar total flavonoid menggunakan persamaan regresi linear $y = bx + a$, dengan $y =$ absorbansi, $x =$ kadar dalam ppm (mg/l). Absorbansi ekstrak yang didapatkan dimasukkan kedalam persamaan regresi linear, selanjutnya dilakukan perhitungan untuk kadar flavonoid total yang hasilnya dinyatakan dalam satuan mg QE/g ekstrak (Puspitasari & Prayogo, 2016; Rahmatika, 2022). Rumus perhitungan kadar total flavonoid menurut Ramadhan *et al* (2021) adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

C = Merupakan konsentrasi kuersetin yang diukur dalam (mg/L)

V = Merupakan total volume etanol yang dinyatakan dalam (ml)

fp = Merupakan faktor yang digunakan untuk pengenceran

M = Menunjukkan pada berat sampel dalam satuan (mg)