

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini akan menggunakan beberapa pelarut ekstraksi, antara lain etanol 70%, etil asetat, dan n-heksan yang berpengaruh terhadap nilai randemen serta kadar flavonoid total, desain penelitian adalah secara eksperimental di laboratorium dengan melakukan analisis deskriptif. Pada penelitian ini serbuk simplisia daun rambai laut (*Sonnerati caseolaris* L.) akan diekstraksi menggunakan metode cara soxhletasi. Selanjutnya ekstrak kental yang dihasilkan oleh proses soxhletasi dengan menggunakan variasi pelarut yang dilakukan 3 kali dengan beberapa pelarut, antara lain etanol 70%, etil asetat, dan n-heksana, kandungan flavonoid total akan ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

B. Lokasi Penelitian

1. Laboratorium Instrument Universitas Ngudi Waluyo Ungaran Fakultas Kesehatan Jurusan Farmasi untuk dilakukan pengecekan kadar flavonoid total pada larutan pembanding kuersetin dan sampel ekstrak daun rambai laut dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis.
2. Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo Ungaran Fakultas Kesehatan Jurusan Farmasi untuk dilakukan proses pemisahan pelarut dengan intisari sampel dengan alat rotary evaporator setelah ekstraksi dan penguapan hasil ekstraksi sampel diuapkan pada waterbath.

3. Determinasi tumbuhan rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L.) untuk mengungkap kebenaran tentang daun rambai laut, dilakukan penelitian di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro (UNDIP). (*Sonneratia caseolaris* L.)

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini yaitu daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L.) yang diambil di Jl.Re.Martadinata, Kota Semarang, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L.) yang diambil lebih tepatnya di rawa-rawa pinggir Jl.Re.Martadinata, Kota Semarang, Jawa Tengah yaitu bagian daun yang sudah cukup tua dan segar tidak mengalami layu.

D. Defenisi Operasional

1. Ekstrak daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L.) merupakan hasil dari ekstraksi daun rambai laut (*Sonnerati caseolaris* L.) yang diekstraksi dengan menggunakan metode soxhletasi.
2. Nilai randemen ekstrak merupakan perbandingan kuantitas minyak yang sudah dihasilkan oleh ekstraksi daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L.)

3. Metode soxhletasi merupakan suatu metode pemisahan suatu senyawa aktif pada tanaman yang dilakukan dengan metode penyaringan berulang-ulang sampai hasilnya sempurna, dan jumlah pelarut yang digunakan minimal.
4. Metode sfektrofotometer UV-Vis adalah metode yang digunakan sebagai penentuan senyawa flavonoid total karena gugus kromofor dan auksokrom ini menyerap radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang UV, konsentrasi flavonoid total dapat diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel pengaruh (variabel bebas)

Variabel pengaruh atau variabel bebas adalah variabel yang bisa memberi pengaruh hasil bisa juga penyebab perbedaan, varibel bebas pada penelitian yaitu adalah metode soxhletasi serta variasi pelarut etanol 70%, pelarut etil asetat dan pelarut n-heksan pada ekstraksi daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L.)

2. Variabel terpengaruh (variabel terikat)

Variabel terpengaruh atau variabel terikat adalah variabel bebas yang dilakukan pengukuran dalam menentukan terdapat atau tidak pengaruh, variabel terikat pada penelitian ini yaitu nilai randemen dan penentuan kandungan flavonoid total dengan alat Spektrofotometri UV-Vis. pada daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L.)

3. Variabel yang bisa dikendalikan (variabel terkendali)

Variabel terkontrol dalam penelitian ini merupakan proses membuat ekstrak kental, peralatan yang digunakan dalam proses ekstraksi, lingkungan dan laboratorium yang digunakan pada saat penelitian daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L.) dan waktu ekstraksi pada proses penelitian.

F. Pengumpulan Data

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L.) dilakukan di Universitas Diponegoro Semarang di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Jurusan Biologi Fakultas MIPA yang bertujuan supaya mencegah atau menjauhi terjadinya kesalahan dalam pengambilan bahan utama untuk penelitian, misal kesalahan ambil tanaman dan kesalahan tercampur tanaman lain maka dilakukan determinasi terlebih dahulu.

2. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini untuk membuat serbuk simplisia daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L.) adalah oven Hock no 4, blender philip 600W, ayakan 40 mesh serta timbangan digital (Ohaus) PAJ1003. Pada proses ekstraksi soxhlet membutuhkan berbagai peralatan untuk ekstraksi, seperti condensor pyrex 500 ml, boiling flask pyrex 250 ml, extractor pyrex 250 ml dan untuk penentuan senyawa flavonoid total menggunakan alat spektrofotometri

Uv-Vis dan kertas saring whatman no 42, alat-alat gelas iwaki 10 ml, 25 ml, 50 ml serta stopwach handphone.

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yang pertama serbuk daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L.) sebanyak 450 gram, selanjutnya untuk metode ekstraksi soxhlet adalah variasi pelarut etanol 70%, pelarut etil asetat dan pelarut n-heksan. Dalam penentuan kadar flavonoid total bahan yang akan digunakan Aluminium Klorida (AlCl_3) 10% merck, asam asetat glasial (CH_3COOH) 5% merck dan etanol pa ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) merck.

3. Pembuatan serbuk simplisia

Daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L.) digunakan pada ekstraksi mengalir serta sortasi basah dilakukan untuk membuang kotoran yang menempel di daun, setelah itu daun rambai laut dirajang dan di jemur dibawah sinar matahari tidak langsung dengan menggunakan metode di angin-anginkan dengan kipas angin yang besar, yang dilakukan guna bertujuan untuk mencegah kerusakan pada daun dan menghindari berkurangnya kandungan metabolit sekunder pada daun. Sortasi kering digunakan untuk memisahkan bahan asing seperti potongan tanaman yang tidak diperlukan lagi dan kontaminan lain yang masih menempel pada simplisia kering. Simplisia selanjutnya dilakukan proses penghalusan dengan alat blender sampai terbentuk serbuk halus, setelah di blender

diayak menggunakan alat ayakan nomor 40 mesh kemudian disimpan pada wadah yang bersih, suhu ruangan kamar dan tertutup rapat.

4. Ekstraksi dengan soxhlet

Ekstraksi dengan soxhlet menggunakan perbandingan 1:5 yaitu 50 gram serbuk dan pelarut 250 ml setiap satu kali ekstraksi. Ekstraksi dilakukan sebanyak 9 kali karna terbatasnya muatan alat soxhlet yang hanya bisa menggunakan maksimal 50 gram serbuk. Serbuk daun rambai laut dibuat 9 bagian ditimbang 50 gram masing-masing menjadi 9 bungkus serbuk, 3 bungkus serbuk simplisia bagian etanol 70%, 3 bungkus etil asetat dan 3 bungkus n-heksan. Serbuk dibungkus menggunakan kertas saring whatman, diikat ujung atas dan bawah menggunakan benang, dan dimasukkan pada tabung soxhlet (thimble). Ditambahkan pelarut untuk 9 bungkus serbuk dengan pelarut yang bervariasi seperti etanol 70 % 3 bungkus, pelarut etil asetat 3 bungkus dan pelarut n-heksan 3 bungkus. Pelarut yang digunakan 250ml pelarut/bungkus setiap 1 kali ekstraksi dan pelarut dibagi menjadi dua bagian yaitu 150 mL masukkan pada labu soklet dan 100 mL masukkan pada tabung soxhlet guna membasahi sampel. Prosedur ekstraksi dilakukan pada suhu 70°C sampai siklus tetesan selesai. Selanjutnya dilakukan pemisahan antara hasil metabolit sekunder dengan pelarut menggunakan alat rotary evaporator dan ekstrak dari proses pemisahan diuapkan dengan alat waterbath sampai terbentuk ekstrak kental (Newita Pratama, Wayan Rai Widarta dan Putu Trisna Darmayanti, 2017).

Hasil randemen ekstrak kental daun rambai laut bisa ditentukan dengan menggunakan rumus perhitungan berikut :

% Randemen =

$$\frac{\text{Bobot Ekstrak (akhir)}}{\text{Bobot Simplisia (awal)}} \mathbf{100\%}$$

5. Uji bebas etanol

Adanya kandungan etanol 70% pada ekstrak ditunjukkan dengan perubahan warna awal dari jingga menjadi hijau kebiruan bila menggunakan uji kualitatif, seperti ekstrak kental yang dapat ditambahkan 2 tetes H₂SO₄ pekat dan 1 ml larutan kalium dikromat. ; Adanya kandungan etanol 70% pada ekstrak ditunjukkan dengan adanya perubahan warna awal dari jingga menjadi hijau kebiruan bila menggunakan uji kualitatif, seperti pada ekstrak kental yang 2 tetes H₂SO₄ pekat dan Jika tidak ada 70 % etanol yang ada, warnanya akan menjadi coklat (Adiningsih, Vifta dan Yuswantina, 2020)

6. Uji bebas etil asetat

Dengan menggunakan uji ini, ekstrak etil asetat ditempatkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan asam sulfat encer, dan tabung dipanaskan. Jika tidak ada bau asetat pada ekstrak dalam tabung reaksi setelah dipanaskan dan digabung dengan asam sulfat lemah, maka dianggap tidak mengandung etil asetat (Merah, 2016)

7. Uji bebas n-heksan

Uji bebas n-heksan dilakukan dengan cara kualitatif, yaitu dengan menggunakan ekstrak kental yang ditambahkan dengan pereaksi 2 tetes

Na_2SO_4 dan KmnO_4 , jika terjadi perubahan warna menjadi warna ungu bisa diartikan ekstrak kental terkandung pelarut n-heksan dan jika terjadi perubahan warna lain bisa dipastikan tidak terkandung pelarut n-heksan pada ekstrak (Mardiyah, Fasya dan Amalia, 2014).

8. Uji kualitatif flavonoid ekstrak daun rambai laut

Uji kualitatif menggunakan tiga ekstrak kental hasil dari ekstraksi soxhlet yaitu etanol 70%, etil asetat dan heksana ditempatkan pada tiga tabung reaksi dengan volume hingga 1 mL. Dengan 2-4 tetes asam klorida kuat dan bubuk magnesium ke masing-masing tabung, tabung reaksi pertama, kedua dan ketiga bereaksi. Adanya flavonoid dalam ekstrak ditunjukkan dengan warna kuning, orange dan merah (Suharyanto dan Prima, 2020).

9. Uji kuantitatif flavonoid ekstrak daun rambai laut

a. Pembuatan larutan baku standar kuersetin 100 ppm

Kuersetin 5 mg larutkan pada 50 mL pelarut etanol pada dalam labu takar sampai diperoleh konsentrasi kuersetin 100 ppm dalam larutan standar, pipet sebanyak 5 ml, 6ml, 7ml, 8ml dan 9 mL di adkan dengan etanol pada masing-masing pada labu takar 10 ml. Larutan standar pada konsentrasi 50 ppm, 60ppm, 70ppm, 80ppm, dan 90 ppm (Sari dan Hastuti, 2020).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum

Dalam tabung reaksi, 1 mL larutan kuersetin 100 ppm ditambahkan 1 mL AlCl_3 10 persen serta 8 mL asam asetat glasial 5%,

dan dilakukan pembacaan gelombang jarak jauh 350-500 nm (Sari dan Hastuti, 2020).

c. Penentuan operating time (OT)

Larutan kuersetin 100 ppm diambil 1 mL direaksikan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5% sehingga total 1 mL. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang tertinggi yang diperoleh pada interval 30 menit sampai tercapai absorbansi yang stabil (Sari dan Hastuti, 2020).

d. Penentuan kurva kalibrasi

Larutan kuersetin pada konsentrasi 50; 60; 70; 80; serta 90 ppm, kemudian dibiarkan selama waktu selama waktu OT yaitu 30 menit dan ukur absorbansi dengan panjang gelombang maksimal yaitu 350-500 nm (Sari dan Hastuti, 2020).

Rumus kurva kalibrasi $y = a + bx$

e. Pengukuran kandungan flavonoid total ekstrak daun rambai laut (*Sonneratia Caseolaris* L.)

Larutan sampel untuk mencapai konsentrasi 1000 ppm, 10 mg ekstrak dilarutkan pada 10 mL pelarut etanol pa. Kemudian pipet 1 mL dari larutan, diikuti 1 mL larutan AlCl_3 10 persen dan 8 mL asam asetat glasial 5%. Sampel dibiarkan selama waktu OT 30 menit. Absorbansinya di ukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum terpanjang mungkin. Untuk masing-

masing sampel, tiga ulangan dilakukan dan didapatkan nilai absorbansi (Sari dan Hastuti, 2020).

$$\text{Flavonoid Total} = \frac{m}{g} = \frac{Y \times N \times V}{W}$$

Keterangan :

Y = konsentrasi senyawa flavonoid yang dihitung dengan persamaan kurva standard (mg g^{-1})

N = nilai pengenceran

V = volume hasil dari ekstraksi (mL)

W = berat serbuk dari daun rambai laut (g)

G. Analisis Data

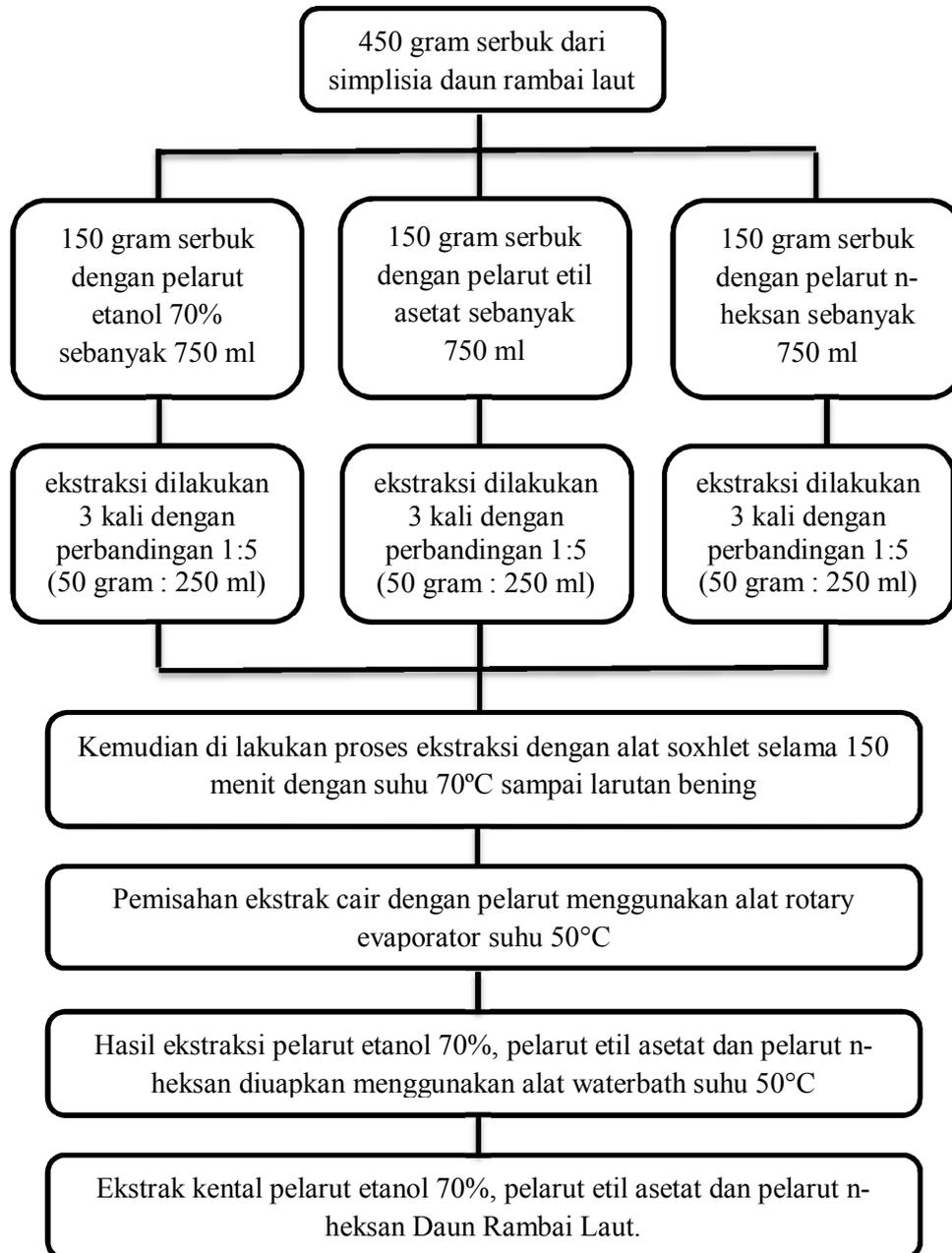
Data yang didapat dianalisis dengan menghitung randemen dari ekstrak yang diperoleh dengan cara perhitungan bobot ekstrak yang diperoleh, dibagi dengan berat serbuk dan di kali 100% untuk mengetahui antara variasi pelarut etanol 70%, pelarut etil asetat serta pelarut n-heksan pelarut yang mana lebih bagus menarik metabolit sekunder senyawa dari daun rambai laut. Selanjutnya dengan cara kualitatif menggunakan metode uji warna dengan menggunakan tabung reaksi untuk membuktikan bahwasanya ekstrak daun rambai laut yang diperoleh mempunyai kandungan flavonoid, berikutnya dianalisis dengan menggunakan metode secara kuantitatif yaitu dengan menggunakan alat Spektrofotometri UV-Vis untuk penentuan senyawa flavonoid total dari metode sokhlet serta variasi pelarut yang berbeda.

Data konsentrasi yang diperoleh dari larutan standar quarcetin untuk total flavonoid kemudian secara kuantitatif diubah menjadi persamaan kurva

standar untuk quarcetin. Persamaan kurva standarnya adalah $y = bx+a$, dimana y menyatakan nilai absorbansi dalam nm dan x menyatakan konsentrasi dalam ppm (mg/L). Absorbansi ekstrak dari pelarut etanol 70%, ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan daun rambai laut yang sudah diperoleh dimasukan dalam persamaan kurva baku sehingga bisa dilihat kadar flavonoid total yang didapatkan dengan variasi pelarut. Data kadar flavonoid total ekstrak etanol 70%, ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan daun rambai laut metode sokhlet dengan variasi pelarut selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan uji analysis of variance (anova) dideskripsikan.

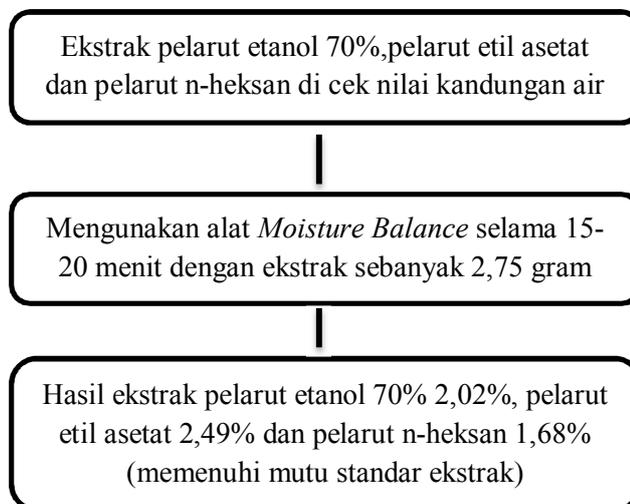
H. Diagram Alir Penelitian

1. Pembuatan Larutan Ekstrak Menggunakan Metode Soxhlet



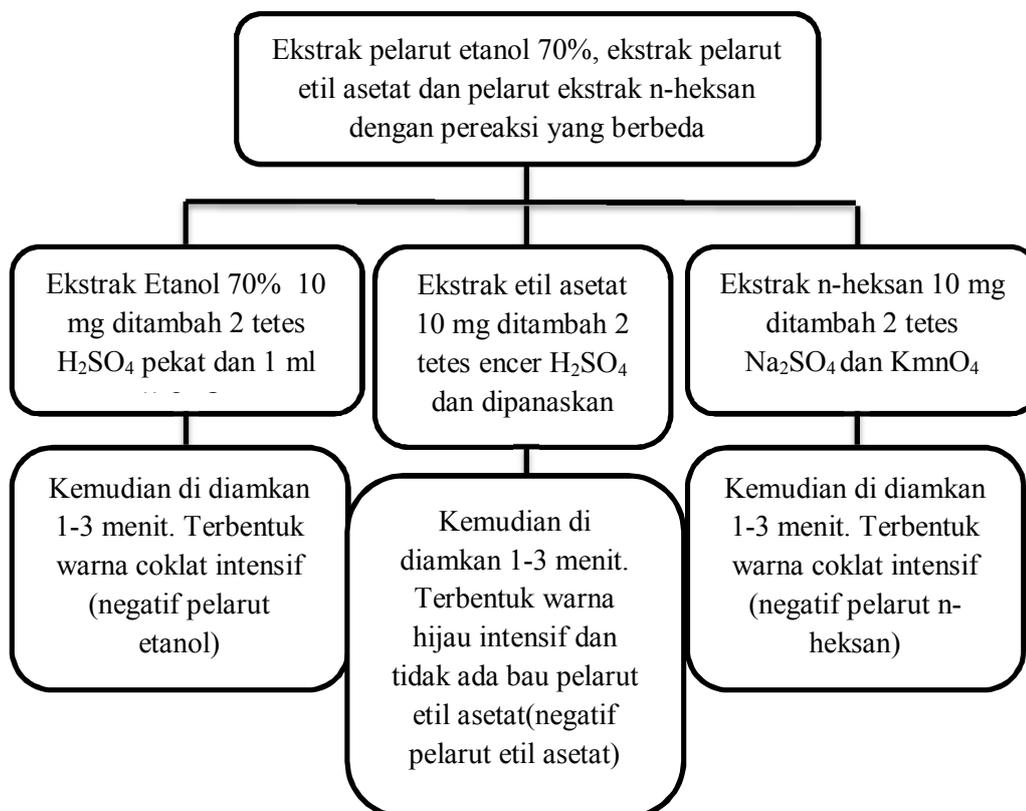
Bagan 3.1 Pembuatan Ekstrak Pelarut Etanol 70%, Pelarut Etil Asetat Dan Pelarut N-Heksan Daun Rambai Laut

2. Pengecekan Kadar Air



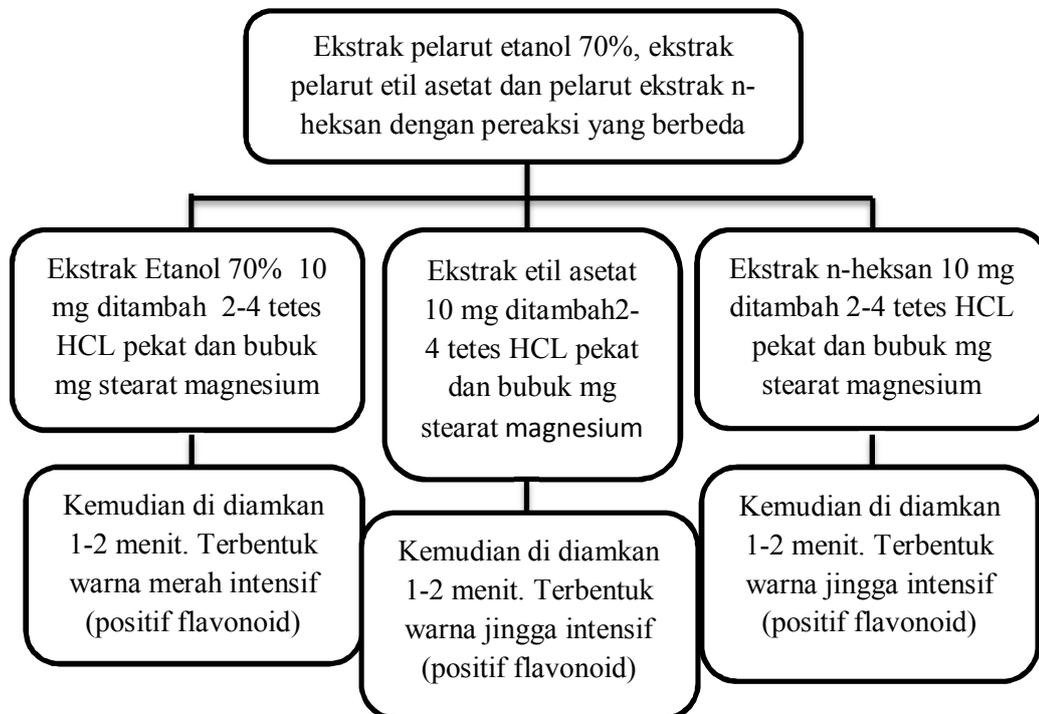
Bagan 3.2 pengecekan kadar air ekstrak pelarut etanol 70%, ekstrak pelarut etil asetat dan ekstrak pelarut n-heksan daun rambai laut.

3. Pengecekan Bebas Pelarut Etanol, Bebas Etil Asetat Dan Bebas N-Heksan Pada Ekstrak Daun Rambai Laut.



Bagan 3.3 Pengecekan Bebas Pelarut Etanol, Bebas Etil Asetat Dan Bebas N-Heksan Pada Ekstrak Daun Rambai Laut.

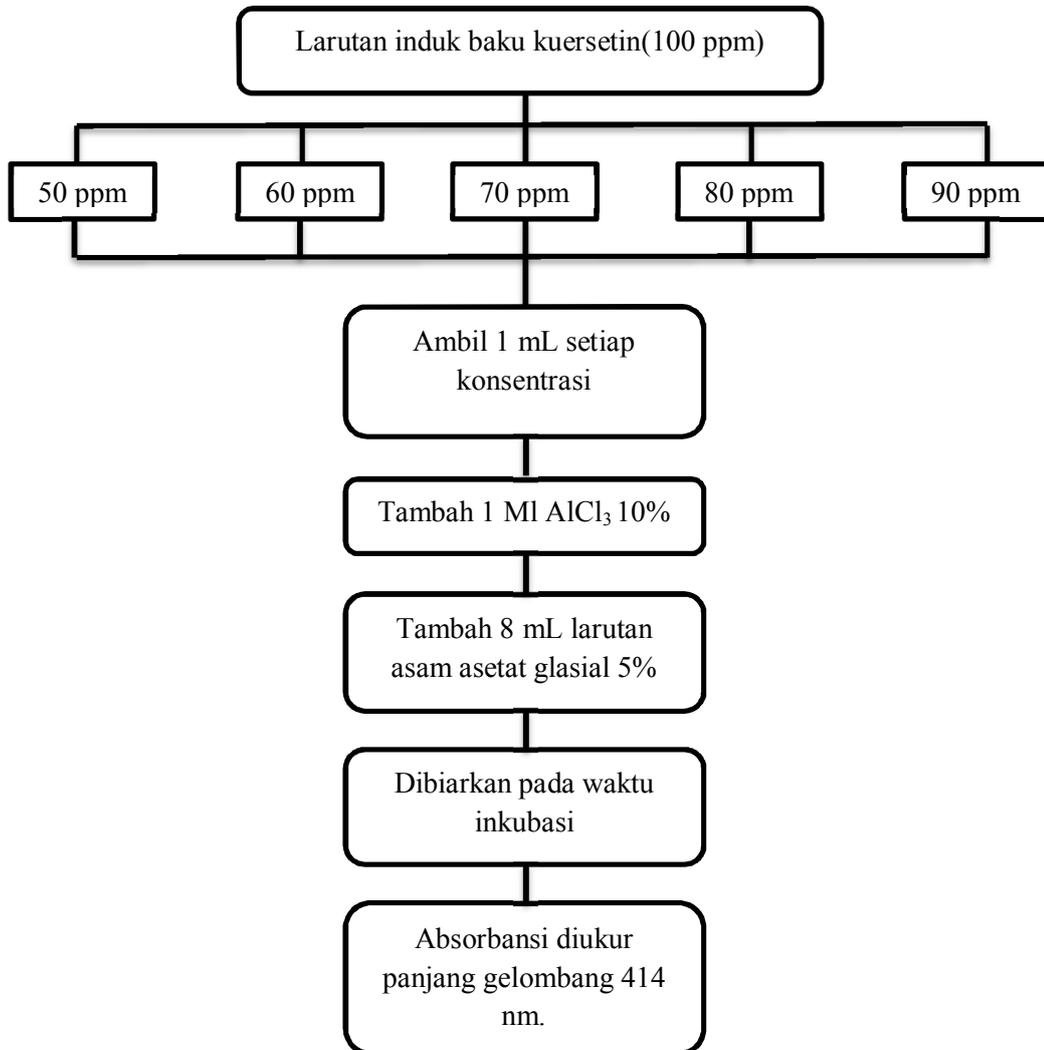
4. Analisis Kualitatif Senyawa Flavonoid Dengan Uji Reaksi Warna



Bagan 3.4 Analisis Kualitatif Senyawa Flavonoid Dengan Uji Reaksi Warna

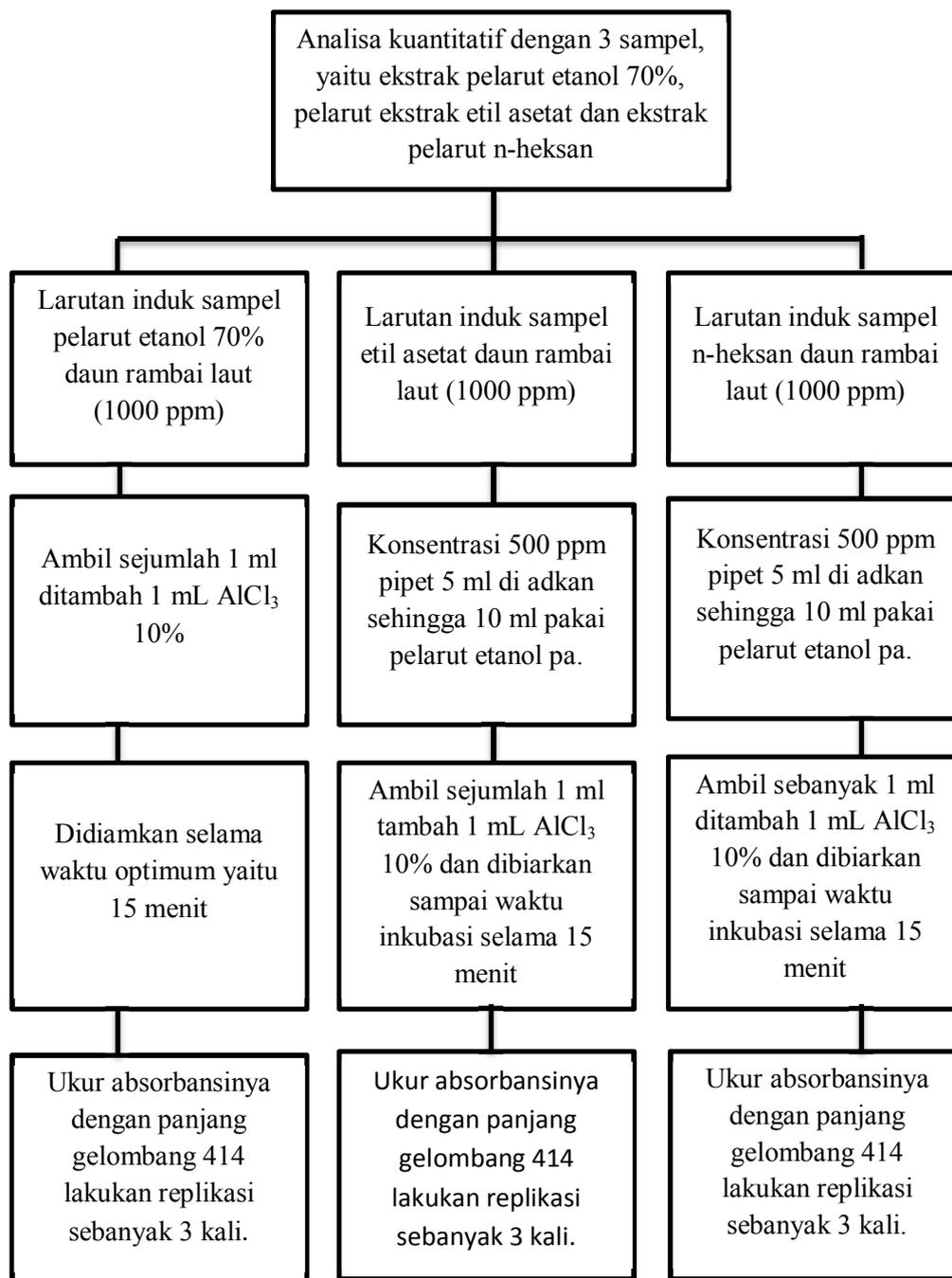
5. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin Menggunakan Spektrofotometri

UV-Vis



Bagan 3.5 Penentuan Kurva Baku Kuersetin Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

6. Analisis Kuantitatif Senyawa Flavonoid Total Dengan Alat Spektrofotometri UV-Vis



Bagan 3.6 Analisis Kuantitatif Senyawa Flavonoid Total Dengan Alat Spektrofotometri UV-Vis