

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui senyawa yang terkandung pada daun kemangi dan penetapan kadar flavonoid total ekstrak daun kemangi. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo. Sampel diperoleh di salah satu pasar di daerah Bandungan, Kabupaten Semarang. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Analisis kualitatif ekstrak daun kemangi dilakukan dengan metode uji tabung dan analisis kuantitatif ekstrak daun kemangi dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### 1. Lokasi

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo.

##### 2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2023-Juni 2023.

#### **C. Populasi dan sampel**

##### 1. Populasi

Pada penelitian ini tanaman kemangi (*Ocimum sanctum* L.) yang diambil dari Bandungan, Kabupaten Semarang.

## 2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.).

### **D. Alat dan Bahan**

#### **1. Alat**

Alat yang digunakan yaitu gelas laboratorium, rotary evaporator, cawan penguap, blender, stopwatch, penangas air, oven listrik, spot plate, neraca analitik, spektrofotometri UV-Vis.

#### **2. Bahan**

Bahan yang digunakan yaitu sampel daun kemangi grade A yang berasal dari salah satu pasar daerah bandungan, kuersetin,  $AlCl_3$ , alcohol, asam asetat, asam klorida, asam nitrat, asam sulfat, serbuk magnesium, natrium karbonat ( $Na_2CO_3$ ), aquadest, etil-asetat, etanol, n-heksan, natrium asetat ( $CH_3COONa$ ), methanol, toluene, aluminium klorida ( $AlCl_3$ ) 10%, asam klorida, (HCL) 2N, asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) 2N, besi (III), klorida ( $FeCl_3$ ) 10%, Larutan pereaksi Bouchardat, Larutan Pereaksi Dragendorff, Larutan pereaksi Liebermann-Bouchard, Larutan pereaksi Mayer, Larutan Pereaksi Molisch, natrium hidroksida (NaOH) 2N, timbal (II) asetat/Pb ( $CH_3COO$ )<sub>2</sub> 0,4 M.

### **E. Definisi Operasional**

#### **1. Variabel Bebas**

Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi

## 2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kandungan fitokimia dan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.).

## 3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali penelitian ini adalah cahaya, waktu, suhu, dan panjang gelombang absorbansi.

## F. Prosedur Penelitian

### 1. Asal tanaman

Daun kemangi berasal dari bandungan, kabupaten semarang. Pemilihan daun kemangi dengan dipetik pada pagi hari dan diambil daun yang memiliki bagian bagus dan memiliki warna yang hijau.

### 2. Determinasi tanaman

Daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) diidentifikasi di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Universitas Diponegoro.

### 3. Alur pembuatan simplisia

Timbang daun kemangi yang sudah dicuci bersih sebanyak 2 kg lalu dikeringkan di bawah sinar matahari dengan ditutupi kain berwarna hitam selama 5 hari sampai diperoleh simplisia yang benar benar kering dan bisa diremas. Setelah itu blender daun kemangi kering hingga menjadi serbuk kemangi.

#### 4. Pembuatan ekstrak etanol daun kemangi

Timbang simplisia daun kemangi sebanyak 296 gram dengan pembanding pelarut 1:10 kemudian dimasukkan botol maserator yang gelap, ditambahkan 2960 ml pelarut. Rendam selama 4-5 hari, pertama sampel sekali-kali diaduk, lalu saring dengan menggunakan kain flanel kemudian didapatkan maserat I. Ulangi proses penyarian dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama sehingga didapatkan maserat II dan III. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan vakum (*rotary evaporator*) sehingga diperoleh ekstrak kental. Hitung rendemen yang diperoleh (Azizah & Widya Wati, 2018).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100 \%$$

#### 5. Standarisasi non spesifik ekstrak

##### a. Uji kadar air ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.)

Ekstrak daun kemangi yang sudah diperoleh ditimbang kurang lebih sebanyak 2 gram diletakkan pada wadah yang sebelumnya telah ditara. Ekstrak dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 menit dan didapatkan hasil. Hasil penetapan kadar air yang baik tidak lebih dari 10%

##### b. Uji kadar abu ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.)

Simplisia daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) sebanyak 2gr ditimbang dimasukkan ke dalam krus yang sebelumnya telah ditimbang berat kosong krus, setelah simplisia dimasukkan selanjutnya krus dimasukkan ke dalam alat pemanas untuk pengecekan kadar abu dengan

suhu 600°C dilakukan / ditunggu selama 3 jam hingga simplisia benar benar menjadi abu yang nantinya hasil digunakan untuk penetapan kadar abu simplisia daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) (Suryani, 2012).

6. Skrining fitokimia ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.)

a. Uji Alkaloid

Ditimbang 500 mg ekstrak kemudian tambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL air, panaskan diatas penangas air selama 2 menit, kemudian dinginkan dan saring. Pipet 3 tetes filtrat pada tabung reaksi lalu tambahkan pereaksi Mayer, jika terbentuk endapan menggumpal berwarna putih dan kuning yang larut dalam etanol P menunjukkan adanya alkaloid (Azizah & Widyawati, 2018).

b. Uji Fenol

Uji besi klorida ( $\text{FeCl}_3$ ): ekstrak diuji dengan penambahan 3-4 tetes larutan besi (III) klorida sehingga terjadi perubahan warna hitam kebiruan menunjukkan adanya fenol (Azizah & Widya Wati, 2018).

c. Uji Flavonoid

Uji shinoda, larutan uji diuapkan hingga kering, ditambah 2-3 tetes etanol, kemudian ditambah serbuk Mg dan beberapa tetes asam klorida 5 M. Warna merah hingga merah lembayung yang timbul menandakan adanya senyawa flavonon, flavonol, flavanonol, dan dihidroflavonol (Azizah & Widya Wati, 2018).

d. Uji Saponin

Pipet secara terpisah 0,5 mL Larutan Uji dan Larutan Pembanding, tambahkan pada masing-masing 1,5 mL etanol P, 0,1 mL aluminium klorida 10 %, 0,1 mL Natrium asetat 1 M dan 2,8 mL air suling. Metode Froth: Sampel (100 mg) dilarutkan dalam 10 mL air dan disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok. Terdapatnya busa yang stabil menunjukkan adanya saponin (Azizah & Widya Wati, 2018).

e. Uji Tanin

1 ml ekstrak tanaman ditambahkan dengan 5 tetes larutan ferri klorida menunjukkan warna hijau hingga biru kehitaman (Azizah & Widya Wati, 2018).

f. Uji Terpenoid

1 ml ekstrak tanaman ditambah 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat perubahan warna ungu atau merah kemudian menjadi biru hijau menunjukkan adanya terpenoid (Azizah & Widya Wati, 2018).

7. Penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.)

a. Pembuatan larutan induk kuersetin

Pembuatan larutan induk dengan menimbang 10mg kuersetin yang selanjutnya dilarutkan dengan 10 ml etanol pa dan didapatkan larutan induk dengan kuersetin konsentrasi 1000 ppm.

b. Pembuatan larutan seri konsentrasi kuersetin

Pembuatan larutan baku kuersetin dibuat dari larutan induk yang sebelumnya telah dibuat dari konsentrasi 1000 ppm dilakukan pengenceran dengan diambil larutan induk yang nantinya dilarutkan dengan etanol pa menjadi larutan dengan konsentrasi 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, dan 80 ppm.

c. Penentuan Panjang gelombang maksimal kuersetin

Penentuan Panjang gelombang maksimal / lamda max kuersetin dilakukan dengan melarutkan / mengencerkan larutan induk dari 1000 ppm menjadi 400 ppm dengan mengambil 4 ml larutan induk kuersetin yang diencerkan ke dalam labu 10 ml dengan penambahan etanol pa. Larutan kuersetin konsentrasi 400 pm diambil sebanyak 1ml dan direaksikan dengan 1ml  $AlCl_3$  10% dan 8 ml asam asetat 5% dan dilakukan pembacaan dengan spektrofotometri UV-Vis dengan pembacaan pada rentang Panjang gelombang 350-500nm.

d. Penentuan *operating time* kuersetin

Proses penentuan *operating time* / waktu stabil dari kuersetin dilakukan dengan menggunakan larutan kuersetin dengan konsentrasi 400 ppm diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan larutan  $AlCl_3$  10% sebanyak 1 ml dan 8 ml asam asetat 5%. Larutan yang sudah dicampurkan dengan beberapa campuran dihomogenkan dan dilakukan pembacaan

absorbansi pada panjang gelombang yang sudah didapat dengan waktu 0-30 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

e. Penentuan larutan kurva baku kuersetin

Pembuatan larutan kurva baku kuersetin dibuat dengan larutan induk dilakukan pengenceran menjadi beberapa larutan seri dengan konsentrasi 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, dan 80 ppm. Masing masing dari larutan seri diambil sebanyak 1ml dan ditambahkan dengan larutan  $\text{AlCl}_3$  10% sebanyak 1 ml dan 8 ml asam asetat 5% dan didiamkan selama kurang lebih 30 menit selama waktu optimum dan dilakukan pembacaan absorbansi larutan seri dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada Panjang gelombang maksimum.

f. Penentuan kadar flavonoid total ekstrak daun kemangi

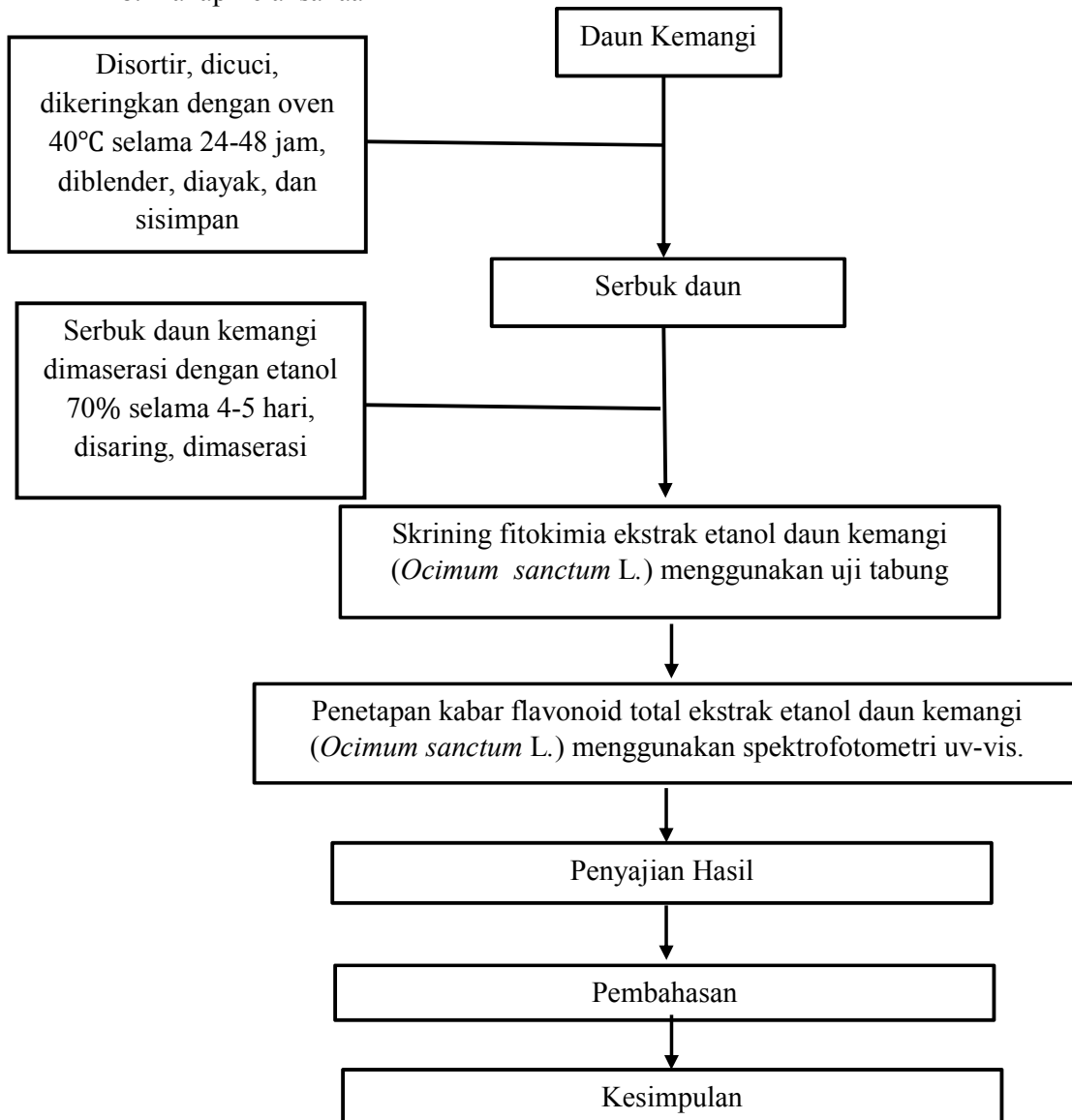
Penentuan kadar flavonoid total dilakukan dengan menimbang 10 mg kuersetin masukkan ke dalam labu ukur 10 mL larutkan dalam etanol pa sampai tanda batas dan diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan induk kuersetin dilakukan pengenceran menjadi beberapa larutan seri yakni menjadi larutan dengan konsentrasi 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, dan 80 ppm. Larutan seri dengan beberapa konsetrasi yang sudah diperoleh selanjutnya direaksikan dengan menambahkan 1 ml larutan  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8m ml asam asetat 5% dan didiamkan selama waktu *operating time* pada suhu ruang kemudian dilakukan pembacaan dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.



Kemudian menimbang 10 mg ekstrak daun kemangi yang sudah diperoleh masukkan kedalam labu ukur 10 mL ditambahkan dengan etanol pa sampai tanda batas dan diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000ppm. Larutan induk dilakukan pengenceran menjadi beberapa larutan seri yakni menjadi larutan dengan konsentrasi 40ppm, 50ppm, 60ppm, 70ppm, dan 80ppm. Larutan seri dengan beberapa konsetrasi yang sudah diperoleh selanjutnya direaksikan dengan menambahkan 1 ml larutan  $AlCl_3$  10% dan 8m ml asam asetat 5% dan didiamkan selama waktu *operating time* pada suhu ruang kemudian dilakukan pembacaan dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis pada Panjang gelombang maksimum. Pembacaan dilakukan dengan melakukan replikasi pada larutan seri sebanyak 3 replikasi sampai diperoleh hasil absorbansi ekstrak daun kemangi serta dilakukan perhitungan kadar flavonoid total dengan rumus di bawah ini (Malik et al., 2014)

$$kadar\ flavonoid\ total = \frac{konsentrasi\ x\ vol\ ekstrak\ x\ 100}{berat\ ekstrak}$$

## 8. Tahap Pelaksanaan



Gambar 3. 1 Prosedur Penelitian

## G. Analisis Data Penelitian

Analisis data pada pengujian ini dilakukan dengan metode statistik menggunakan aplikasi SPSS 16 dengan menggunakan perangkat windows menggunakan parameter uji yaitu Uji Descriptives yang terdapat pada

aplikasi SPSS 16 untuk menganalisis data hasil perhitungan rata rata kadar flavonoid dengan pembanding kuersetin dengan berbagai konsentrasi larutan.