

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan dalam jenis penelitian eksperimental murni yaitu untuk menentukan penetapan kadar flavonoid ekstrak kasar dan terpurifikasi biji pinang (*Areca catechu L.*) dengan metode spektrofotometri UV-Vis .

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada Bulan Oktober – januari 2020

2. Tempat penelitian

Pengujian kadar flavonoid total dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran dan determinasi dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas Sains dan Matematika Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

C. Populasi dan sampel

1. Populasi

dalam penelitian ini adalah biji pinang (*Areca catechu L.*) yang diambil dari Temu kencono (Gunung Pati)

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah biji pinang (*Areca catechu L.*) yang didapatkan dari daerah Gunung Pati . Determinasi tanaman dilakukan

di laboratorium Ekologi dan Biosistematik Fakultas Sains dan Matematika Biologi Universitas Diponegoro Semarang dengan karakteristik bahan yang akan digunakan adalah buah pinang dengan spesifikasi biji satu, bentuk seperti kerucut pendek dengan ujung membulat, pangkal agak datar dengan suatu lekukan datar, panjang 15-30 mm, permukaan luar berwarna kecoklatan sampai coklat kemerahan, agak berlekuk-lekuk menyerupai jala dengan warna yang lebih muda biji pinang. (*Areca catechu L.*)

D. Alat dan Bahan

1. Bahan uji

Pada penelitian ini bahan yang akan digunakan adalah biji pinang (*Areca catechu L.*), etanol 96%, n-heksan, aquades, etil asetat, kuersetin.

2. Alat penelitian

Seperangkat alat ekstrak dengan metode maserasi, blender, oven, spektrofotometri UV-Vis, gelas standar, gelas ukur, batang pengaduk, kertas saring, corong kaca, erlenmeyer, rotary evaporator RE 100-Pro, waterbath memmert dan corong pisah.

E. Definisi Oprasional

1. Variabel Bebas

Pada penelitian ini variabel bebasnya adalah ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*)

2. Variabel tergantung

Kadar flavonoid ekstrak kasar dan terpurifikasi biji pinang (*Areca catechu L.*)

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol penelitian ini adalah cahaya, waktu, suhu, dan panjang gelombang absorpsi

F. Prosedur Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Biologi Universitas Diponegoro Semarang dengan karakteristik bahan yang akan digunakan adalah buah pinang dengan spesifikasi biji satu, bentuk seperti kerucut pendek dengan ujung membulat, pangkal agak datar dengan suatu lekukan datar, panjang 15-30 mm, permukaan luar berwarna kecoklatan sampai coklat kemerahan, agak berlekuk-lekuk menyerupai jala dengan warna yang lebih muda

2. Pembuatan simplisia biji inang

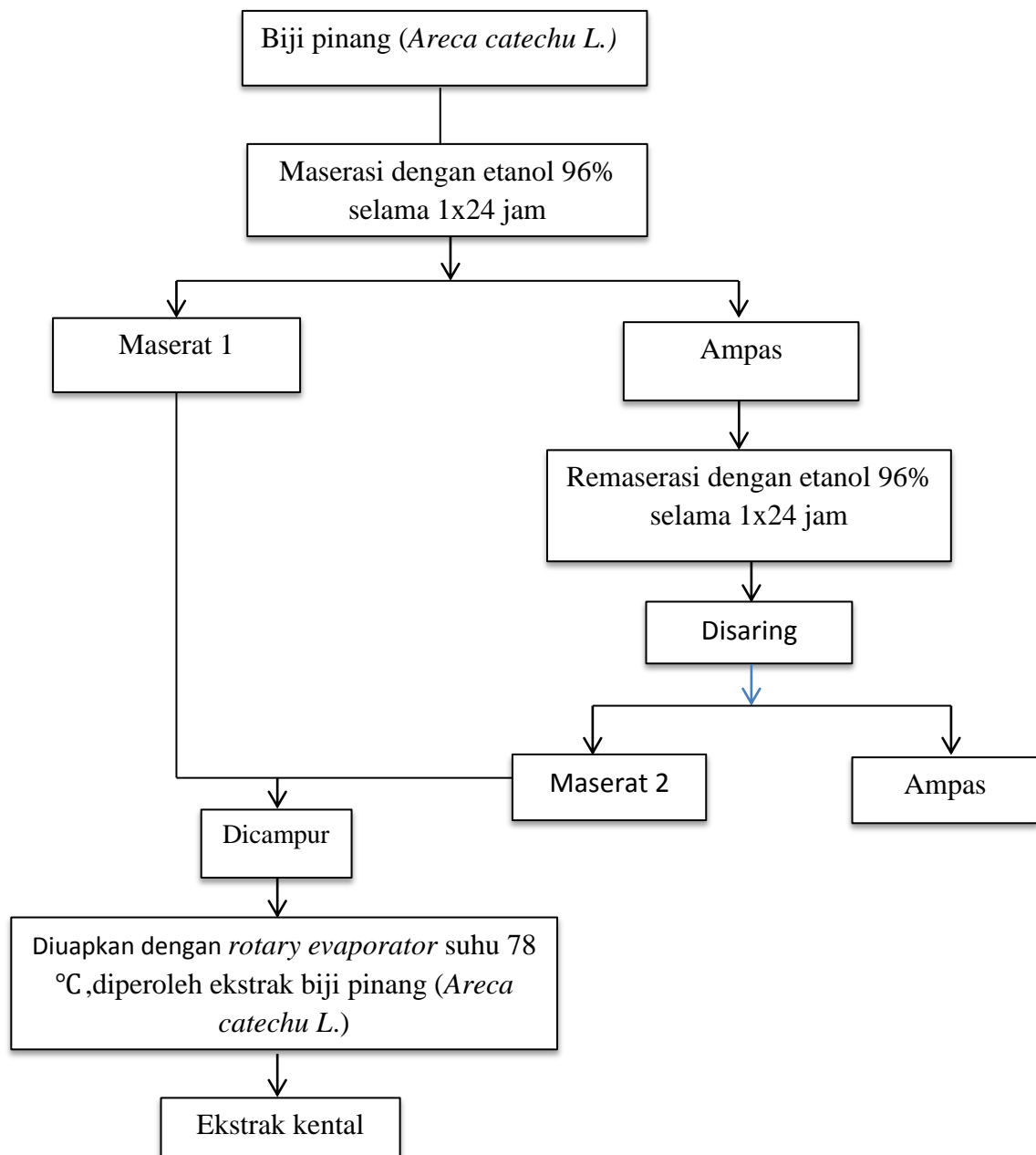
Penyiapan bahan biji pinang (*Areca catechu*) dari pohon di pilih warna kuning, selanjutnya dilakukan sortasi untuk memilih biji pinang nya saja yang paling bagus. Setelah itu, biji pinang (*Areca catechu*) dirajang lalu dikeringkan selama 3-4 hari. Kemudian, dihaluskan menggunakan blender, setelah di blender maka di dapatkan serbuk halus dan kemudian dilakukan ekstraksi.

3. Pembuatan Ekstraksi

a. Ekstraksi

Pembuatan ekstrak biji pinang (*Areca catechu*) dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk biji pinang (*Areca catechu L.*) sebanyak 300 mg yang telah diblender dan diayak, dilarutkan dalam etanol 96 %. Pelarut yang digunakan sebanyak 3000 ml maserasi dilakukan selama 2 hari dan dilanjutkan remaserasi selama 2 hari dalam ruangan yang terlindung cahaya matahari dan dilakukan pengadukan 1x24 jam. kemudian ekstrak yang diperoleh dari maserat pertama disaring menggunakan kain flannel. Setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dilakukan remaserasi. Maserat pertama dan maserat kedua yang telah dikumpulkan, selanjutnya diuapkan menggunakan penangas air (*rotary evaporator*) dengan suhu 78°C sehingga mendapatkan ekstrak kental dan murni (Rahmadani *et al.*, 2008).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental (g)}}{\text{Bobot bahan sampel (g)}} \times 100\%$$



Gambar 2.6 Skema kerja pembuatan Ekstrak biji pinang(*Areca catechu L.*)

b. Purifikasi

Setelah dilakukan ekstraksi terhadap simplisia biji pinang (*Areca catechu L.*) dan menghasilkan ekstrak kasar, selanjutnya ekstrak kasar dibagi menjadi empat bagian,

- 1) Ekstrak pertama tidak diberi perlakuan,
- 2) Purifikasi n-heksan

Berdasarkan (Suryani, 2012) yang telah dimodifikasi: Ekstrak terpurifikasi biji pinang ditimbang 10 gram, dilarutkan dengan 100 ml etanol 96% dan dimasukkan dalam corong pisah. Kedalam larutan tersebut ditambahkan 100 ml n-Heksan. Corong dikocok secara terus menerus, kemudian didiamkan. Setelah terpisah menjadi 2 lapisan, maka lapisan air dan Heksan dipisahkan dengan berat jenis n-Heksan adalah 0,655g/ml, maka lapisan n-Heksan akan berada diatas lapisan air. Purifikasi dengan n-Heksan diulangi hingga diperoleh lapisan n-Heksan berubah warna menjadi bening. Larutan hasil pemisahan tersebut dikumpulkan dan dievaporasi sehingga didapatkan ekstrak terpurifikasi dan fase heksana.

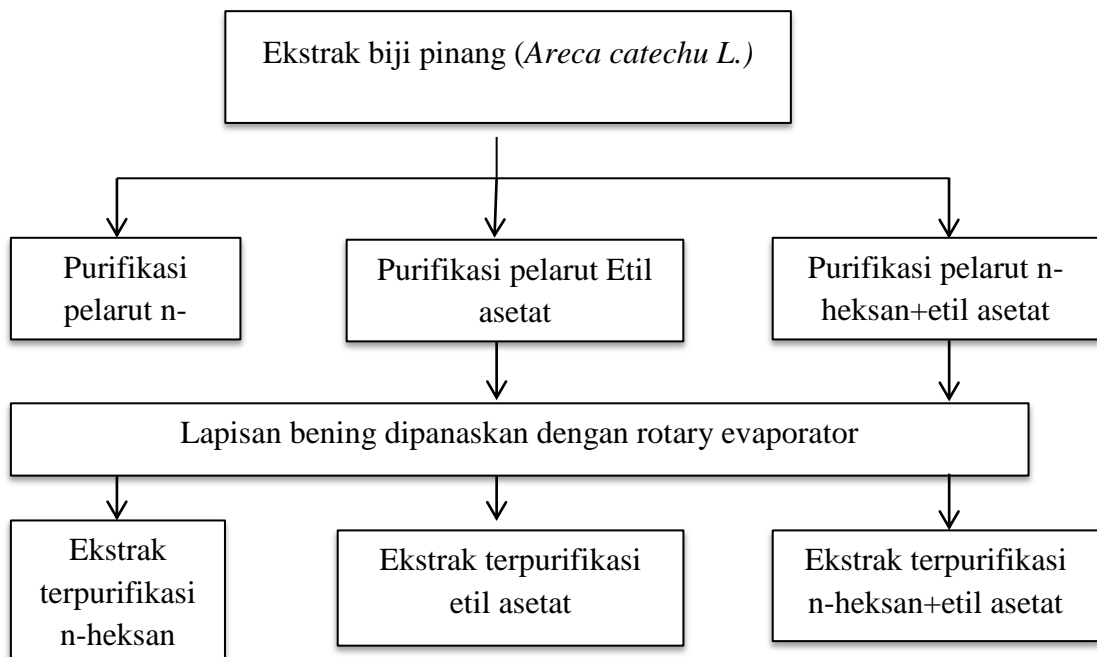
- 3) Purifikasi etil asetat

Sebanyak 10 gram ekstrak terpurifikasi biji pinang (*Areca catechu L.*) dimasukkan dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 100 ml (1 : 1) hingga homogen. Suspensi dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan etil asetat 100 ml. Dilakukan penggojogan kurang lebih satu menit, kemudian

didiamkan. Penambahan etil asetat dilakukan hingga diperoleh larutan etil asetat yang bening dimana lapisan etil asetat akan berada diatas. Kemudian dipekatkan hingga diperoleh ekstrak kental dan dihitung rendamennya (Agustina, *et al.*, 2015).

4) Purifikasi campuran etil asetat dan n-heksan

Sebanyak 10 gram ekstrak biji pinang (*Areca catechu L*) kemudian dilakukan ekstraksi cair-cair bertingkat dengan pelarut n-heksan dan etil asetat. Proses purifikasi ekstrak dihentikan hingga fase n-heksan dan etil asetat yang dihasilkan berwarna jernih. Fase aquadest yang telah terbebas dari komponen non polar selanjutnya dipekatkan dan dihitung rendamennya (Januarti dan Wijayanti, 2018). Larutan hasil pemisahan tersebut dikumpulkan dan dievaporasi sehingga didapatkan ekstrak terpurifikasi.



Gambar 2.7 Skema kerja pembuatan Ekstrak Terpurifika biji pinang (*Areca catechu L.*)

4. Skrining fitokimia

Identifikasi flavonoid dilakukan pada ekstrak etanol biji pinang dengan uji shinoda, yaitu sebanyak masing – masing 10 mg sampel dimasukan ke dalam tabung reaksi dicampur dengan etanol sebanyak 2 mL dan dipanaskan diatas penangas air kemudian ditambahkan serbuk magnesium dan HCL 2 N. Warna merah hingga merah muda menunjukan adanya flavonoid (urip *et al.*,2012).

a. Saponin

Dilakukan dengan cara sebanyak 0,1 g ekstrak terpurifikasi biji pinang dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 ml air panas lalu dikocok selama 30 detik. Tes buih positif mengndung saponin bila terjadi buih yang stabil selama 30 menit dengan tinggi 3 cm di atas permukaan cairan.

b. Tanin

Dilakukan dengan cara 3 ml ekstrak terpurifikasi biji pinang dimasukan kedalam tabung reaksi tambahkan 2-3 tetes FeCL₃ warna hitam kebiruan atau hijau menunjukan positif senyawa tanin

c. Fenol

Menimbang 0,25 gram ekstrak terpurifikasi biji pinang masukan kedalam tabung reaksi tambahkan 3-4 tetes FeCL₃ warna biru sampai hijau kehitaman menunjukan positif senyawa fenol

5. Penentuan Kadar Flavonoid Total

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimun Kuersetin

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan cara membuat larutan induk kuersetin 1000 $\mu\text{g/mL}$ yaitu dengan menimbang kuersetin sebanyak 10,0 mg ditambahkan etanol 96% analisis ke dalam labu ukur 10 mL (Januarti dan Wijayanti, 2018). Larutan induk 1000 ppm dipipet 1 mL dan dilarutkan dalam labu takar 10 mL menggunakan etanol pro analisis hingga batas (kadar kuersetin menjadi 100ppm). Sejumlah 0,5 mL larutan kuersetin 100 ppm direaksikan dengan 1,5 mL etanol 96%, 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL asam asetat 5%, dan 2,8 mL etanol pa. Kemudian dilakukan pembacaan pada rentang panjang gelombang 350-500 nm dengan panjang gelombang maksimal 413,50 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis sebanyak 3x replikasi

b. Penentuan *Operating Time* Kuersetin

Penentuan operating time dilakukan dengan mengambil sebanyak 0,5 mL dari larutan kuersetin 100 $\mu\text{g/mL}$ dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu direaksikan dengan 1,5 mL etanol 95%; 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL asam asetat 1 M, dan 2,8 mL etanol pa. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu rentang waktu 0-30 menit, sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Ipandi, Triyasmono, & Prayitno, 2016).

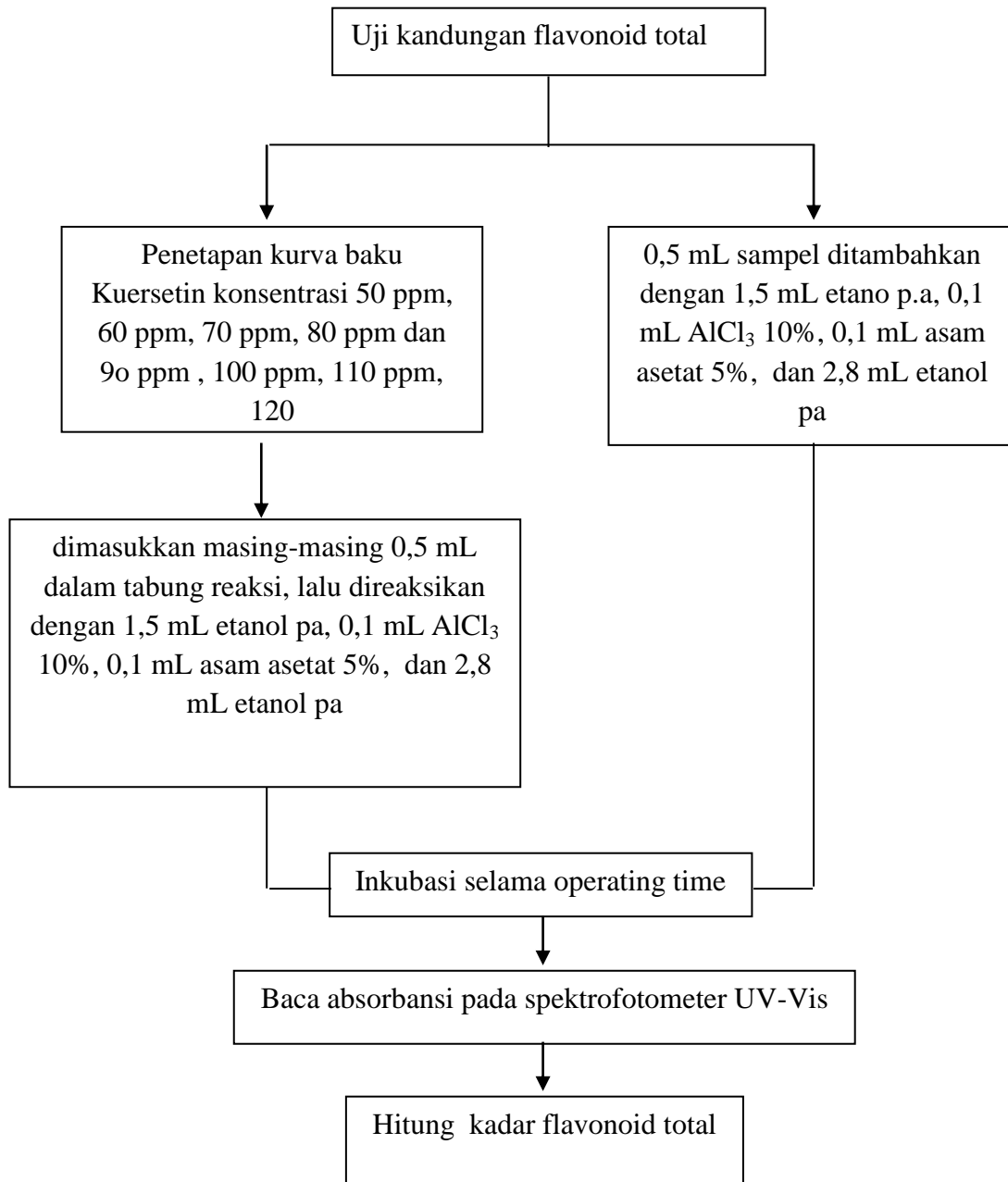
c. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Kurva baku dibuat menggunakan larutan induk dengan kadar 1000 ppm dengan cara memipet larutan 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 11 mL, 12 mL masing-masing dilarutkan dalam labu takar 10 mL menggunakan pelarut etanol pro analisis (kadar kuersetin menjadi, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, 90 ppm, 100 ppm, 110 ppm, 120 ppm). Dipipet masing-masing sejumlah 0,5 ml ditambah dengan 1,5 mL etanol 96%, 0,1 ml aluminium klorida (AlCl_3) 10%, 0,1 mL asam asetat 5% dan ditambahkan akuades 2,8 mL. Setelah itu diinkubasi selama operating time dan serapannya diukur pada λ maks yang diperoleh menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Kemudian dibuat kurva kalibrasi dengan menghubungkan nilai serapan sebagai koordinat (y) dan konsentrasi larutan standar sebagai absis (x) (Azizah *et al.*, 2014).

d. Penetapan kadar flavonoid total ekstrak kasar dan terpurifikasi biji pinang (*Areca catechu L.*)

Kandungan flavonoid total merujuk pada prosedur Chang *et al.*, (2002) dengan beberapa konsentrasi menggunakan kuersetin sebagai standar. Penentuan kadar flavonoid total yaitu dengan menimbang ekstrak etanol biji pinang masing-masing sebanyak 10,0 mg kemudian larutkan dalam labu takar 10 mL menggunakan etanol 96% analisis hingga batas. Larutan kemudian dipipet sebanyak 0,5 mL ditambahkan dengan 1,5 mL etanol 96%, 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL asam asetat 5%, dan 2,8 mL etanol pa. Setelah diinkubasi selama operating time

yang diperoleh dari kuersetin, kemudian diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang yang telah didapatkan dengan pembandingan kuersetin (λ maks). Dilakukan 3 kali pengulangan.



Gambar 2.8 Skema kerja penetapan kadar flavonoid total biji pinang (*Areca catechu L.*)

G. Perhitungan kadar

1. Konsentrasi 50 ppm
 $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$
 $V_1 \times 100\text{ppm} = 10 \times 50\text{ppm}$
 $V_1 = 5 \text{ mL}$
2. Konsentrasi 60 ppm
 $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$
 $V_1 \times 100\text{ppm} = 10 \times 60\text{ppm}$
 $V_1 = 6 \text{ mL}$
3. Konsentrasi 70 ppm
 $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$
 $V_1 \times 100\text{ppm} = 10 \times 70\text{ppm}$
 $V_1 = 7 \text{ mL}$
4. Konsentrasi 80 ppm
 $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$
 $V_1 \times 100\text{ppm} = 10 \times 80\text{ppm}$
 $V_1 = 8 \text{ mL}$
5. Konsentrasi 90 ppm
 $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$
 $V_1 \times 100\text{ppm} = 10 \times 90\text{ppm}$
 $V_1 = 9 \text{ mL}$
6. Konsentrasi 100 ppm
 $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$
 $V_1 \times 100\text{ppm} = 10 \times 100\text{ppm}$
 $V_1 = 10 \text{ mL}$
7. Konsentrasi 110 ppm
 $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$
 $V_1 \times 100\text{ppm} = 10 \times 110\text{ppm}$
 $V_1 = 11 \text{ mL}$
8. Konsentrasi 120 ppm
 $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$
 $V_1 \times 100\text{ppm} = 10 \times 120\text{ppm}$
 $V_1 = 12 \text{ mL}$

H. Analisis Data

Analisi kadar flavonoid total dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis dan membandingkan Kadar flavonoid total ekstrak kasar dan terpurifikasi menggunakan uji ANOVA dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi sampel pada panjang gelombang 350-500 nm dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Nilai absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan

garis linear $y = bx + a$ yang diperoleh dari kurva standar kuersetin. Kurva standar diperoleh dari hubungan antara konsentrasi kuersetin (mg/L) dengan absorbansi. Hasil dinyatakan dalam satuan mg ekivalen kuersetin dengan cara membuat persamaan dalam jumlah mg/L sampel yang digunakan dengan kesetaraan kuersetin tiap gram dan dinyatakan dalam satuan mgQE/g sampel.

Keterangan :

Y = Nilai absorbansi

x = Kadar flavonoid

a, b = Konstanta