

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yaitu penelitian yang bertujuan untuk menggambarkan adanya senyawa-senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, fenol yang terkandung dalam biji rambutan (*Nephelium lappaceum* L.). Adapun tahapan-tahapan dalam penelitian ini yaitu tahap determinasi biji rambutan, ekstraksi biji rambutan, uji skrining fitokimia dan melakukan uji kromatografi lapis tipis.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak maserasi biji rambutan dan menggunakan pelarut etanol 70%. Sampel dari penelitian ini yaitu sebagian ekstrak biji rambutan.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Proses determinasi biji rambutan dilakukan di lembaga ilmu pengetahuan Indonesia balai konservasi tumbuhan Kebun Raya Purwodadi, sedangkan penelitian biji rambutan dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Sedangkan waktu penelitian yang digunakan adalah mulai dari tahap persiapan, tahap pelaksanaan, tahap skrining fitokimia sampai tahap kromatografi lapis tipis akan dilakukan selama kurang lebih 3 bulan dari bulan Februari hingga April 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Dalam penelitian ini terdapat variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak biji rambutan (*Nephelium lappaceum* L.). Variabel terikatnya adalah uji skrining fitokimia dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

| Variabel | Definisi Operasional | Alat Ukur | Hasil Ukur |
|-----------------------|---|--------------------------------|-----------------------------------|
| Ekstrak Biji Rambutan | Ekstrak maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan dievaporasi pelarut etanol nya | Timbangan | Rendeman |
| | Karakteristik hasil skrining fitokimia meliputi uji flavonoid, tanin, fenol, Alkaloid, Saponin | Secara visual atau penglihatan | Uji warna sesuai dengan literatur |
| | Karakteristik KLT senyawa metabolit sekunder menggunakan fasa diam siliki gel 60 F ₂₅₄ dengan fasa gerak tertentu dan penampak noda spesifik | Pengamatan visual noda | Rf dan warna noda yang spesifik |

3.6 Alat dan Bahan

Pada penelitian ini alat yang digunakan meliputi alat penyemprot, pipet tetes, lempeng KLT, corong gelas, pipa kapiler, cawan penguap, batang pengaduk, lampu uv, kertas saring, gelas ukur, beaker glass, sendok tanduk, toples kaca, timbangan analitik, cawan, ayakan 60 mesh, oven, loyang, tabung reaksi, rak tabung reaksi, dan penggaris. Bahan yang digunakan etanol 70%, biji rambutan, kloroform, asam asetat pekat, H₂SO₄ pekat, HCl pekat, AlCl₃.

3.7 Prosedur Penelitian

Dalam metode penelitian ini dilakukan beberapa prosedur penelitian diantaranya, prosedur pembuatan ekstrak biji rambutan, prosedur uji skrining fitokimia dan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) biji rambutan (*Nephelium lappaceum L.*).

1.7.1 Determinasi Biji Rambutan

Determinasi dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi.

1.7.2 Pembuatan Ekstrak Biji Rambutan (Putri dkk., 2015)

Tahap pembuatan ekstrak biji rambutan, yaitu :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
2. Memasukkan 480gram simplisia kering biji rambutan ke dalam toples
3. Menuang 1,5L pelarut etanol 70% ke dalam toples yang kemudian ditutup
4. Mendinginkan selama 48 jam sambildiaduk tiap 6 jam sekali
5. Menyaring ekstrak biji rambutan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60⁰C kemudian menghilangkan sisa pelarut menggunakan waterbath hingga diperoleh ekstrak kental
6. Menimbang ekstrak kental yang diperoleh dan ditentukan rendemennya

1.7.3 Prosedur uji Skrining Fitokimia Biji Rambutan (*Nephelium lappaceum L.*)

1.7.3.1 Uji Flavonoid (Harborne, 2008; dalam Taher, 2011).

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Mengambil ekstrak biji rambutan sebanyak 0,5 gram
3. Memasukkan ke dalam tabung reaksi
4. Melarutkan 1-2 mL metanol panas 50%

5. Menambahkan logam Mg dan 0,5 mL HCl pekat
6. Melihat larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid

1.7.3.2 Uji Tanin (Sangi et.al., 2009).

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Mengambil ekstrak biji rambutan sebanyak 0,5 gram
3. Memasukkan ke dalam tabung reaksi
4. Menambahkan FeCl_3 1% 2-3 tetes
5. Memperoleh warna hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin katekol dan warna biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin galat

3.7.3.3 Uji Fenol (Murni, 2012)

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Mengambil ekstrak biji rambutan sebanyak 0,5 gram
3. Memasukkan ke dalam tabung reaksi
4. Menambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 5%
5. Melihat larutan berwarna hijau atau hijau biru maka menunjukkan senyawa fenol

3.7.3.4 Uji Saponin (Sangi et.al., 2009).

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Mengambil ekstrak biji rambutan sebanyak 0,5 gram
3. Memasukkan ke dalam tabung reaksi
4. Menambahkan air (1:1) lalu dikocok selama 1 menit dan menimbulkan busa
5. Menambahkan 2 tetes HCl 1 N
6. Membiarkan selama 10 menit, bila busa yang terbentuk bisa tetap stabil maka ekstrak positif mengandung saponin

3.7.3.5 Uji Alkaloid (Hrborne, 1987; dkk., 2016).

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Mengambil ekstrak biji rambutan sebanyak 0,5 gram
3. Memasukkan ke dalam tabung reaksi
4. Menambahkan 0,5 mL HCl 2% dan larutan dibagi dalam tiga tabung
5. Menambahkan 2-3 tetes pereaksi Dragendroff pada tabung 1
6. Menambahkan 2-3 tetes pereaksi mayer pada tabung 2
7. Menambahkan 2-3 tetes preaksi wagner pada tabung 3
8. Melihat tabung 1 terbentuk endapan coklat kemerahan menandakan adanya alkaloid
9. Melihat tabung 2 terbentuk endapan putih menandakan adanya alkaloid
10. Melihat tabung 3 terbentuk endapan coklat menandakan adanya alkaloid

3.7.4 Prosedur Uji Kromatografi Lapis Tipis Biji Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.)

3.7.4.1 Flavonoid

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Menyiapkan fase gerak kloroform : metanol = 9:1 (v/v) (Akbar, 2010)
3. Mengambil ekstrak pekat sebanyak 1g
4. Mengencerkan dalam 1 mL etanol 70%
5. Menyiapkan bejana pengembang sebagai tempat menampung campuran eluen/fase gerak
6. Melakukan penjenuhan bejana
7. Memasukkan campuran eluen sebanyak 5 mL
8. Menutup bejana pengembang selama 1 jam

9. Menyiapkan plat silika gel F₂₅₄ berukuran 7 x 2 cm² yang sudah dipanaskan dalam oven pada suhu 105⁰C selama 20 menit
10. Menotolkan sebanyak 5-10 totolan ekstrak yang sudah di encerkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler
11. Mengeringkan dan dielusi dalam fase gerak
12. Menghentikan elusi setelah fase gerak sampai garis batas ± 1 cm
13. Menguapi plat silika dengan amoniak
14. Mengoven plat silika pada suhu 60⁰C selama 2 menit
15. Mengamati masing-masing hasil nodanya dibawah sinar uv pada panjang gelombang 366 nm
16. Melihat warna plat silika, jika berwarna biru kehijauan menunjukkan senyawa flavonoid
17. Menghitung nilai Rf-nya

3.7.4.2 Tanin

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Menyiapkan fase gerak butanol : asam asetat : air = 14 : 1 : 5 (v/v) (Sriwahyuni, 2010)
3. Mengambil ekstrak pekat sebanyak 1g
4. Mengencerkan dalam 1 mL etanol 70%
5. Menyiapkan bejana pengembang sebagai tempat menampung campuran eluen/fase gerak
6. Melakukan penjenuhan bejana
7. Memasukkan campuran eluen sebanyak 5 mL
8. Menutup bejana pengembang selama 1 jam
9. Menyiapkan plat silika gel F₂₅₄ berukuran 7 x 2 cm² yang sudah dipanaskan dalam oven pada suhu 105⁰C selama 20 menit

10. Menotolkan sebanyak 5-10 totolan ekstrak yang sudah di encerkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler
11. Mengeringkan dan dielusi dalam fase gerak
12. Menghentikan elusi setelah fase gerak sampai garis batas ± 1 cm
13. Menyemprot plat silika dengan preaksi FeCl_3
14. Melakukan oven pada plat silika dengan suhu 60°C selama 2 menit
15. Mengamati masing-masing hasil nodanya dibawah sinar uv pada panjang gelombang 366 nm
16. Melihat warna plat silika, jika berwarna ungu menunjukkan senyawa tanin
17. Menghitung nilai R_f -nya

3.7.4.3 Fenol

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Menyiapkan fase gerak etil asetat : metanol : air (100 : 13,5 : 10) (Hayati et al., 2012)
3. Mengambil ekstrak pekat sebanyak 1g
4. Mengencerkan dalam 1 mL etanol 70%
5. Menyiapkan bejana pengembang sebagai tempat menampung campuran eluen/fase gerak
6. Melakukan penjenuhan bejana
7. Memasukkan campuran eluen sebanyak 5 mL
8. Menutup bejana pengembang selama 1 jam
9. Menyiapkan plat silika gel F_{254} berukuran $7 \times 2 \text{ cm}^2$ yang sudah dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 20 menit
10. Menotolkan sebanyak 5-10 totolan ekstrak yang sudah di encerkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler

11. Mengeringkan dan dielusi dalam fase gerak
12. Menghentikan elusi setelah fase gerak sampai garis batas ± 1 cm
13. Menyemprot plat silika dengan FeCl_3
14. Mengamati masing-masing hasil nodanya dibawah sinar uv pada panjang gelombang 366 nm
15. Melihat warna plat silika, jika berwarna hijau atau biru kehitaman menunjukkan senyawa fenol
16. Menghitung nilai Rf-nya

3.7.4.4 Saponin

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Menyiapkan fase gerak kloroform : metanol : air = (13 : 7 : 2) (v/v) (Harbone cited suharto et al., 2012)
3. Mengambil ekstrak pekat sebanyak 1g
4. Mengencerkan dalam 1 mL etanol 70%
5. Menyiapkan bejana pengembang sebagai tempat menampung campuran eluen/fase gerak
6. Melakukan penjenuhan bejana
7. Memasukkan campuran eluen sebanyak 5 mL
8. Menutup bejana pengembang selama 1 jam
9. Menyiapkan plat silika gel F_{254} berukuran $7 \times 2 \text{ cm}^2$ yang sudah dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 20 menit
10. Menotolkan sebanyak 5-10 totolan ekstrak yang sudah di encerkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler
11. Mengeringkan dan dielusi dalam fase gerak
12. Menghentikan elusi setelah fase gerak sampai garis batas ± 1 cm

13. Melakukan oven pada plat silika dengan suhu 60°C selama 2 menit
14. Mengamati masing-masing hasil nodanya dibawah sinar uv pada panjang gelombang 366 nm
15. Melihat warna plat silika, jika berwarna bercak coklat atau ungu menunjukkan senyawa saponin
16. Menghitung nilai Rf-nya

3.7.4.5 Alkaloid

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Menyiapkan fase gerak metanol : kloroform = 0,5 : 9,5 (v/v) (Hayati et al., 2012)
3. Mengambil ekstrak pekat sebanyak 1g
4. Mengencerkan dalam 1 mL etanol 70%
5. Menyiapkan bejana pengembang sebagai tempat menampung campuran eluen/fase gerak
6. Melakukan penjenuhan bejana
7. Memasukkan campuran eluen sebanyak 5 mL
8. Menutup bejana pengembang selama 1 jam
9. Menyiapkan plat silika gel F₂₅₄ berukuran 7 x 2 cm² yang sudah dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 20 menit
10. Menotolkan sebanyak 5-10 totolan ekstrak yang sudah di encerkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler
11. Mengeringkan dan dielusi dalam fase gerak
12. Menghentikan elusi setelah fase gerak sampai garis batas ± 1 cm
13. Mendeteksi plat silika dengan preaksi Dragendroff
14. Melakukan oven pada plat silika dengan suhu 60°C selama 2 menit

15. Mengamati masing-masing hasil nodanya dibawah sinar uv pada panjang gelombang 366 nm
16. Melihat warna plat silika, jika berwarna coklat jingga menunjukkan senyawa alkaloid
17. Mengitung nilai Rf-nya

3.8 Analisis Data

Analisis data meliputi penentuan rendemen, dan Rf masing-masing noda kelompok senyawa metabolit sekunder, Penentuan tersebut diulang tiga kali, selanjutnya ditentukan standar deviasinya. Analisis noda hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Rf masing-masing senyawa matabolit sekunder yang ada lalu di bandingkan dengan literatur.