

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode penelitian eksperimental laboratorium menggunakan perbandingan metode ekstraksi untuk mengetahui jumlah perbedaan rendemen ekstrak dan kadar flavonoid total didalam ekstrak daun sirih hijau (*piper batle L.*).

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu determinasi tumbuhan, pengumpulan bahan, pembuatan serbuk simplisia, melakukan dua metode ekstraksi, analisis kualitatif flavonoid, penentuan kadar flavonoid total menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis, dan analisa data.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi merupakan keseluruhan dari objek yang akan diteliti. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk simplisia daun sirih hijau (*Piper betle L*) dari daerah Singosari Malang.

Sampel merupakan bagian dari populasi yang diteliti. Sampel yang digunakan adalah 600 gram serbuk simplisia daun sirih hijau (*Piper betle L*).

3.3 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Januari hingga Februari 2019. Lokasi penelitian dilaboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Hasil Ukur	Alat Ukur	Skala Ukur
Kadar flavonoid total	Mengukur Banyaknya kadar flavonoid pada ekstrak daun sirih hijau (<i>piper betle</i> L.) dari dua metode ekstraksi	Kadar flavonoid total.	Spektrofotometer UV-Vis.	Nominal

3.5 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu pipet tetes, neraca analitik , erlenmayer, corong kaca, batang pengaduk, kertas saring, corong, beaker glass, toples kaca gelap, seperangkat alat ekstraksi perkolasi, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, timbangan analitik, bejana pengembang, plat slika, spektrofotometri UV-Vis, kuvet, kain kasa steril, water bath, lap dan tisu.

Bahan yang digunakan ekstrak daun sirih hijau etil asetat, aquadest, serbuk Mg, HCl pekat, etanol 70%, larutan kuersetin, etanol p.a, FeCl₃10%, AlCl₃10%, natrium asetat 1M, aquades.

3.6 Pengumpulan Data

3.6.1 Determinasi Daun Sirih Hijau

Determinasi dilakukan dengan identifikasi sampel daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang dilakukan dibalai Material Medica Batu.

3.6.2 Pembuatan Serbuk Daun Sirih Hijau

Daun sirih hijau segar ditimbang sebanyak 1700 gram, kemudian dicuci dengan air dan dilakukan sortasi basah, setelah dicuci dilakukan proses pengecilan ukuran dengan cara dipotong – potong untuk memperkecil ukuran. Selanjutnya dilakukan proses pengeringan dengan cara diangin- anginkan selama beberapa hari pada udara terbuka dengan tidak terkena sinar matahari langsung.

Setelah sampel kering dilakukan proses sortasi kering yang bertujuan untuk memisahkan daun sirih hijau dengan benda asing seperti batu, ranting, dan daun tumbuhan lain. Kemudian daun sirih hijau di perkecil ukuran menjadi serbuk dengan cara di blender dan di ayak dengan ukuran 30 *mess*. Hasilserbuk simplisia daun sirih hijau yang diperoleh 720 gram.

3.6.3 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak daun sirih hijau menggunakan metode maserasi dan perkolasi dengan pelarut etanol 70%

1. Metode Maserasi

Sebanyak 100 gram serbuk simplisia daun sirih hijau dimasukan kedalam bejana gelap, lalu ditambahkan 500 mL pelarut etanol 70% dan ditutup rapat menggunakan aluminium foil serta terhindar dari cahaya matahari langsung. Proses perendaman selama 3 hari dengan sesekali dilakukan pengocokkan.

Setelah 3 hari, filtrat disaring dengan menggunakan *corong buchner*. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan *watterbath* pada suhu 50 - 55 °C. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

2. Metode Perkolasi

Sebanyak 100 gram serbuk simplisia daun sirih hijau dimasukkan kedalam bejana gelap, lalu ditambahkan 250 mL pelarut etanol 70% dan ditutup rapat menggunakan aluminium foil serta terhindar dari cahaya matahari langsung. Dilakukan proses perendaman selama \pm 6 jam. Setelah itu dimasukkan kedalam selongsong alat perkolator dan dilakukan proses perkolasi dengan penambahan pelarut baru 250 mL etanol 70%. Proses ekstraksi dihentikan apabila sudah tidak ada lagi tetesan. Hasil filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *watterbath* pada suhu 50 - 55 °C. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Identifikasi Flavonoid

Sebanyak 25 mg ekstrak daun sirih hijau ditambahkan dengan serbuk Mg \pm 1 gram dan HCl pekat 5 ml. Terbentuknya warna merah, orange atau hijau menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Hanani, 2015).

3.7.2 Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

Pembuatan larutan standar didahului dengan pembuatan larutan induk 100 μ g/mL yang dibuat dengan melarutkan 2,5 mg kuersetin ke dalam 25 mL etanol p.a (Hanani, 2015).

3.7.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Analisis metode penetapan kadar flavonoid total dilakukan berdasarkan metode Chang et al (2002) yang menyatakan metode terpilih untuk analisis

flavonoid secara spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400nm sampai dengan 800nm (Hanani, 2015).

3.7.4 Pembuatan Kurva Standart

Pembuatan larutan standar didahului dengan pembuatan larutan induk 100 $\mu\text{g/mL}$ yang dibuat dengan melarutkan 2,5 kuersetin kedalam 25 mL etanol p.a. Dibuat larutan dengan konsentrasi berturut-turut 20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$. Dari masing-masing konsentrasi larutan standar kuersetin dipipet 0,5 ml, kemudian ditambahkan 0,1 ml AlCl_3 10%, 0,1 ml natrium asetat 1M dan 2,8 ml aquades. Selanjutnya, larutan dikocok dengan baik dan dibiarkan bereaksi selama 30 menit pada suhu ruangan. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 437 nm (Hanani, 2015).

3.7.5 Penetapan Kadar Flavonoid Total

1. Ekstrak hasil metode maserasi

Kandungan flavonoid total merujuk pada prosedur Chang et al., (2002) dengan beberapa konsentrasi menggunakan kuersetin sebagai standar. Ditimbang ekstrak daun sirih hijau metode maserasi sebanyak 20 mg dan dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a kemudian disentrifuge 15 menit 2000 rpm.

Dari larutan stok sampel dipipet sebanyak 0,5 mL, ditambahkan AlCl_3 10%, 0,1 mL, natrium asetat 1 M 0,1 mL dan 2,8 mL aquabidestillata. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan diukur absorbansinya pada

spektrofotometer UV- Visible dengan panjang gelombang 437 nm. Larutan sampel dibuat dalam 2 kali replikasi.

2. Ekstrak hasil metode perkolasi

Kandungan flavonoid total merujuk pada prosedur Chang et al., (2002) dengan beberapa konsentrasi menggunakan kuersetin sebagai standar. Ditimbang ekstrak daun sirih hijau metode perkolasi sebanyak 20 mg dan dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a kemudian disentrifuge 15 menit 2000 rpm.

Dari larutan stok sampel dipipet sebanyak 0,5 mL, ditambahkan AlCl_3 10%, 0,1 mL, natrium asetat 1 M 0,1 mL dan 2,8 mL aquabidestillata. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV- Visible dengan panjang gelombang 437 nm. Larutan sampel dibuat dalam 2 kali replikasi.

3.7.6 Pembuatan larutan blanko.

Dibuat campuran 0,1 ml natrium asetat 1M, AlCl_3 10%, 0,1 mL, dan 2,8 ml aquades, 10 ml etanol pa . Dibiarkan bereaksi selama 30 menit pada suhu ruangan. Diukur serapan pada 437 nm (Hanani, 2015).

3.8 Analisa Data

Data hasil pengamatan yang diperoleh, kemudian dianalisis dengan uji Formalitas. Jika hasil uji formalitas tidak signifikan maka dilakukan uji lanjut dengan uji *Mann whitney* non parameter menggunakan program SPSS 16 sehingga dapat diketahui adanya perbedaan nyata dari perbandingan dua metode ekstraksi daun sirih hijau (*piper betle* L.) terhadap kadar flavonoid yang dihasilkan.