

BAB III METODE PENELITIAN

1.1 JENIS PENELITIAN

Jenis penelitian yang dilakukan adalah metode penelitian deskriptif. Yaitu penelitian ini dilakukan dengan mencari kadar dari 2 sampel dan membandingkan hasilnya. Penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali pada 2 jenis sampel untuk meningkatkan ketepatan (akurasi) dari proses penelitian yang dilakukan, dan jumlah sampel yang digunakan sebanyak 2 sampel.

1.2 WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Waktu penelitian dilakukan pada bulan 12 – 28 Januari 2022 di Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

1.3 ALAT DAN BAHAN

1.3.1 Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah timbangan analitik, gelas Erlenmeyer, gelas kimia, gelas arloji, cawan porselin, corong, labu terukur, batang pengaduk, pipet tetes, pipet volume, sendok besi, mikropipet, inkubator, waterbath, magnetic stirer, kuvet, toples kaca, vial, dan Spektrofotometri Uv – Vis.

1.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah sampel daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*), aquades, aluminium foil, AlCl₃ 10%, asam klorida, etanol p.a, etanol 70%, kertas perkamen, kertas saring, kuersetin, logam magnesium, Natrium asetat 1 M.

1.4 VARIABEL PENELITIAN

Variabel yang diteliti dalam penelitian ini meliputi:

- **Variable bebas**

Variable bebas dalam penelitian ini adalah Perbedaan Tempat Tumbuh.

- **Variable terikat**

Variable terikat dalam penelitian ini adalah kadar total Flavonoid pada Daun Kamboja Putih.

1.5 DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur
Perbedaan Tempat Tumbuh	Ketinggian mempengaruhi organisme tumbuhan	Altimeter	Meter
Kadar Flavonoid total dari Daun Kamboja Putih	Penentuan Flavonoid total secara kuantitatif pada Daun Kamboja Putih yang dinyatakan dalam satuan %	Spektrofotometri Uv - Vis	Rasio

1.6 METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang digunakan mengacu pada metode Chang et al. (2002).

1.6.1 Pembuatan simplisia

Dibersihkan daun kamboja putih dengan mencuci di air bersih yang mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada permukaan daun, lalu dipotong kecil – kecil, dilanjutkan dengan tahap pengeringan dengan cara dioven dengan suhu 60 °C selama 8 jam. Setelah kering, lalu diserbukkan hingga halus dengan grinder dan diayak dengan ayakan no. 100 kemudian sampel siap untuk diekstraksi.

1.6.2 Pembuatan ekstrak daun kamboja putih

Pembuatan ekstrak daun kamboja putih dilakukan dengan cara mengekstraksi serbuk simplisia menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan simplisia dan pelarut yaitu 1: 10. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi yang dilakukan dengan cara sampel daun kamboja putih yang telah diserbukkan ditimbang sebanyak 100 gram, dimasukkan dalam wadah maserasi. Kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 750mL dibiarkan selama 24jam dan wadah maserasi ditutupi aluminium foil agar terlindung dari cahaya matahari. Diaduk rendaman sesekali selama 3 hari. Selanjutnya disaring untuk

memisahkan ampas dan filtratnya. Kemudian tambahkan 250 ml etanol 70% untuk membilas ampas untuk memaksimalkan proses pengambilan senyawa – senyawa yang terdapat pada sampel daun. Filtrat hasil ekstrak selanjutnya diuapkan dengan waterbath dengan suhu 60° hingga pekat seperti madu.

1.6.3 Penyiapan Larutan

1.6.3.1 Pembuatan larutan kuersetin

Sebanyak 10 mg kuersetin ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest sebagai larutan stok.

1.6.3.2 Pengenceran kuersetin

Dibuat pengenceran kuersetin dengan konsentrasi 20, 30, 40, 50, 60 µg/ml sebagai larutan kuersetin pembanding. Pertama Dipipet 2 mL larutan kuersetin 100 ppm dan dilarutkan dalam 10 mL aquades untuk larutan kuersetin 20 ppm. Dipipet 3 mL larutan kuersetin 100 ppm dan dilarutkan dalam 10 mL aquades untuk larutan kuersetin 30 ppm. Dipipet 4 mL larutan kuersetin 100 ppm dan dilarutkan dalam 10 mL aquades untuk larutan kuersetin 40 ppm. Dipipet 5 mL larutan kuersetin 100 ppm dan dilarutkan dalam 10 mL aquades untuk larutan kuersetin 50 ppm. Dan dipipet 6 mL larutan kuersetin 100 ppm dan dilarutkan dalam 10 mL aquades untuk larutan kuersetin 60 ppm.

1.6.4 Analisis Kualitatif

Menimbang ekstrak Sebanyak 30 mg ditambahkan sedikit bubuk logam magnesium serta beberapa tetes HCl pekat p.a. . Reaksi positif mengandung flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah magenta.

1.6.5 Analisis Kuantitatif

1.6.5.1 Penetapan Panjang Gelombang (λ) maksimum kuersetin

Diambil 0,5 mL dari masing-masing larutan kuersetin pembanding dan ditambahkan dengan 1,5 mL metanol. Selanjutnya ditambahkan AlCl₃ 10% 0,1 mL, 0,1 mL natrium asetat 1 M dan 2,8 mL aquades. Kemudian diinkubasi selama 30 menit dimaksudkan agar reaksi berjalan sempurna, sehingga intensitas warna yang dihasilkan lebih maksimal. Lalu absorbansi dari larutan pembanding diukur dengan spektrofotometri UV sinar tampak pada panjang gelombang 300-500 nm.

Setelah diperoleh absorbansi dari masing-masing larutan pembanding selanjutnya dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh regresi persamaan linear.

1.6.5.2 Pengukuran serapan blangko

Pengujian dilakukan dengan dicampurkan 1,0 ml larutan $AlCl_3$ 10% dan 0,1 mL natrium asetat. Ditambahkan metanol hingga volumenya 5 ml. dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar kemudian diukur absorbansinya pada Panjang gelombang maksimum yang telah diukur sebelumnya.

1.6.5.3 Pengukuran Kadar Flavonoid Total Pada Daun Kamboja Putih

Ditimbang Sebanyak 20 mg sampel dan dilarutkan dalam 10 ml etanol. Sebanyak 0,5 ml sampel uji ditambahkan dengan 1,5 ml methanol. kemudian ditambahkan 0,1 ml $AlCl_3$ 10%, serta 0,1 ml natrium asetat 1M, dan 2,8 ml aquadest. Diinkubasi selama 30 menit. Kemudian absorbansi diukur menggunakan Spektrofotometri UV- VIS pada Panjang gelombang 436,5 nm.

1.7 Metode Analisis

Pada penelitian ini dilakukan analisis kadar flavonoid total pada daun kamboja putih. Sampel yang digunakan adalah daun kamboja putih yang tumbuh di Kabupaten Malang dan Kabupaten Pausuran. Pada pengujian sampel dilakukan replikasi sebanyak 3 kali pengulangan untuk meningkatkan ketepatan (akurasi) pada pengujian. Metode analisis yang digunakan adalah ekstraksi maserasi dengan menggunakan etanol 70% serta diukur dengan spektrofotometer UV-VIS. Hasil akhir yang diperoleh menunjukkan kadar flavonoid pada daun kamboja putih.

1.8 Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data

Data yang telah diperoleh dalam penelitian ini adalah data kuantitatif kadar flavonoid total dari daun kamboja putih. Data yang diperoleh merupakan data dari absorbansi larutan pembanding kuersetin, Kadar total dari senyawa dihitung dengan memasukkan kedalam persamaan regresi linear $y = ax + b$, yang diperoleh dari kurva kalibrasi pembanding dan hasil dinyatakan dalam satuan persen (%). Kemudian kadar yang diperoleh dibandingkan dengan uji statistik.