

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian bersifat eksperimental yang dilakukan dengan melihat perbedaan kandungan flavonoid ekstrak dan fraksi yang ada pada buah dan biji pare.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2020 – Maret 2021 di Laboratorium Kimia Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Sahid Surakarta.

#### **3.3 Alat dan Bahan**

##### **a. Alat**

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas (Pyrex), alat kromatografi kolom (Lokal), botol penyemprot penampak bercak (Pyrex), cawan porselin (China), chamber (Lokal), corong pisah (Pyrex), eksikator (Lokal), lampu UV254 nm dan lampu UV366 nm (Philips), neraca analitik (Acis), pipa kapiler (Na heparin), sentrifuge (Taiwan), spektrofotometer UV-Vis (Gynesis), dan *vacuum rotary evaporator* (Bio Base).

##### **b. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil (Klinpak), aquadest (Emsure), etil asetat (Emsure), kuersetin (Merck),

buah dan biji pare (*Momordica charantia* L.), N-heksana (Emsure), lempeng KLT (Merck), GF 254 (Merck), etanol Pa (Emsure),  $\text{AlCl}_3$  (Emsure), kloroform (Emsure), etanol 70 % (Rachma Sari), dan kalium asetat (Emsure).

### **3.4 Variabel Penelitian**

Variabel penelitian adalah poin-poin yang akan menjadi karakteristik suatu penelitian. Dalam penelitian ini ada dua jenis Variabel :

#### **a. Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak dan fraksi pada buah dan biji pare (*Momordica charantia* L.)

#### **b. Variabel Terikat**

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kandungan flavonoid dari buah dan biji pare (*Momordica charantia* L.) serta penampakan spot pada plat KLT.

### **3.5 Definisi Operasional**

Definisi operasional yaitu definisi yang membatasi ruang lingkup atau Variabel-variabel yang diteliti. Definisi operasional pada penelitian ini adalah :

- a. Konsentrasi ekstrak buah dan biji pare adalah besarnya konsentrasi ekstrak etanol buah dan biji pare yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 2 %, 4 %, 6 % dan 8 %.
- b. Penampakan warna spot plat KLT adalah warna spot yang muncul pada plat KLT dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm serta reagen semprot  $\text{AlCl}_3$  yang menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid.

- c. Pemantauan ekstrak secara kualitatif dengan KLT bertujuan untuk mengetahui gambaran banyaknya komponen senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak. Elusi KLT ekstrak etanol biji pare dilakukan menggunakan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak Etil asetat : n-heksana (85:15).
- d. Uji Kuantitatif konsentrasi larutan standar dengan hasil serapannya yang diperoleh dari pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer *ultraviolet-visible* (UV-VIS) pada panjang gelombang maksimum.
- e. Kandungan flavonoid adalah besarnya kandungan flavonoid pada ekstrak serta fraksi n-heksana, etil asetat dan air ekstrak daging dan biji buah pare (*Momordica charantia* L.).
- f. Fraksi yang digunakan adalah n-heksana, etil asetat dan air. Ekstrak etanol buah pare dipartisi dengan n-heksana untuk memisahkan metabolit yang terkandung di dalamnya dengan metabolit yang lain. Ekstrak etanol buah pare dipartisi dengan n-heksana dengan perbandingan 1:10 (satu bagian ekstrak etanol dengan 10 bagian n-heksana). Fraksinasi yang kedua menggunakan pelarut etil asetat. Fraksi etanol-air perlu mendapatkan perlakuan di atas waterbath selama 1-3 jam untuk mendapatkan fraksi yang lebih kental.

### **3.6 Jalannya Penelitian**

#### **3.6.1 Determinasi Tanaman**

Determinasi tanaman dilakukan di Universitas Setia Budi. Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo-Solo 57127.

### 3.6.2 Penyiapan Simplisia

Penyiapan simplisia meliputi (Prasetyo, 2013) :

a. Pengumpulan bahan baku

Pengumpulan bahan baku yang digunakan adalah bagian buah dan biji dari tanaman pare (*Momordica charantia L.*).

b. Sortasi Basah

Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan cecairan (kotoran dan benda asing lain) dari bahan simplisia. Pembersihan simplisia dari tanah dapat mengurangi jumlah kontaminasi mikrobiologi.

c. Pencucian

Pencucian dilakukan dengan air mengalir dan menggunakan air bersih.

d. Perajangan

Dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan dan penggilingan. Semakin tipis bahan yang dikeringkan, semakin cepat penguapan air yang dikandung, sehingga mempercepat waktu pengeringan.

e. Pengeringan

Pengeringan bertujuan agar simplisia tidak cepat rusak dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lebih lama. Dengan berkurangnya kadar air, maka reaksi enzimatik dapat dicegah sehingga penurunan mutu atau kerusakan simplisia dapat dihindari. Pengeringan menggunakan oven dapat dilakukan pada suhu 30°C-90°C (terbaik 60°C). Jika bahan aktif tidak tahan panas atau mudah menguap maka pengeringan dilakukan dengan suhu serendah mungkin, misal 30°C-45°C.

f. Sortasi kering

Tujuan sortasi adalah untuk memisahkan benda asing, seperti bagian tumbuhan yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang masih tertinggal pada simplisia kering yang telah di oven.

g. Pengepakan dan penyimpanan

Simplisia disimpan pada suhu yang sesuai dengan sifat dan ketahanan simplisia, serta dihindarkan dari faktor-faktor yang dapat mempengaruhi mutu simplisia.

### 3.6.3 Ekstraksi Sampel

Sebanyak 1 kg simplisia kering buah dan biji pare diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70 %. Ekstrak simplisia Buah dan biji dimasukkan kedalam wadah maserasi dan diekstraksi dengan etanol 70 % hingga sampel terendam sempurna, lalu disimpan selama 1x24 jam dalam wadah tertutup dan terlindungi dari cahaya matahari langsung, sampel diaduk pada jam keenam setelah penyimpanan. Sampel disaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh filtrat. Residu dimaserasi kembali dengan cairan penyari etanol 70% yang baru. Dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali. Filtrat yang diperoleh, dikumpulkan dan diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental (Pratiwi *et al.*, 2019).

### 3.6.4 Fraksi Sampel

Sebanyak 20 gram ekstrak kental etanol buah dan biji pare dilarutkan dalam etanol 70 % sebanyak 150 mL. Selanjutnya dimasukkan ke dalam corong pisah lalu ditambahkan 200 mL N-heksana, dikocok secara perlahan-lahan selama 5 menit, setelah itu didiamkan hingga terjadi pemisahan antara ekstrak N-heksana dan air. Ekstrak N-heksana dipisahkan dengan lapisan air, kemudian ekstrak air dipartisi kembali dengan N-heksana hingga 6 kali sampai larutan berwarna bening. Selanjutnya ekstrak air di partisi kembali menggunakan etil asetat dengan proses yang sama dengan N-heksana. Ekstrak N-heksana cair, ekstrak etil asetat cair dan ekstrak air diupkan sehingga diperoleh fraksi kental (Pratiwi *et al.*, 2019).

### 3.6.5 Uji Kualitatif

Ekstrak etanol, Fraksi N-heksana, fraksi air dan fraksi etil asetat buah dan biji pare ditotolkan pada lempeng KLT gel 60 F254 yang berukuran 7 x 2 cm dengan menggunakan pipa kapiler, kemudian dimasukan kedalam chamber yang berisi eluen etil asetat:N-heksana dengan perbandingan 85:15 sebanyak 5 mL. Selanjutnya profil kromatogram diamati pada sinar tampak, UV 254 nm dan UV 366 nm (Pratiwi *et al.*, 2019). Spot yang muncul diidentifikasi kandungan flavonoidnya dengan reagen semprot  $AlCl_3$ . Apabila spot berwarna kuning menunjukkan sampel positif mengandung flavonoid (Robinson, 1983).

### **3.7 Analisis Kandungan Flavonoid Total**

#### **a. Pembuatan Larutan Sampel**

Pembuatan larutan sampel ekstrak daging buah dan biji pare ditimbang sebanyak 50 mg, kemudian dilarutkan dengan 5 mL etanol 70 % dalam gelas kimia 100 mL. Larutan diaduk menggunakan batang pengaduk, setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Gelas kimia dibilas dengan etanol 70 % kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Setelah diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 1000 ppm, dilakukan pengenceran dengan cara dipipet 1 mL larutan sampel 1000 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan dengan etanol 70 % sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm, lalu dipipet sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan 1,5 mL etanol 70%, 0,1 mL aluminium klorida 10%, 0,1 mL kalium asetat 1 M dan ditambahkan air suling 2,8 mL kemudian kocok sampai homogen. Larutan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer *UV-Visible* pada panjang gelombang maksimum kemudian dilakukan perhitungan kadar flavonoid (Syamsul dkk, 2019).

#### **b. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum**

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan cara membuat larutan standar kuersetin 400 ppm kemudian sebanyak 1 mL larutan kuersetin 400 ppm tersebut direaksikan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  2 % di dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 8 mL asam asetat 5 % ke dalam larutan dan dilakukan

pembacaan pada rentang panjang gelombang 400-500 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

**c. Penentuan OT (*Operation Time*)**

Penentuan operating time dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 mL larutan kuersetin 200 ppm dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu direaksikan dengan 1 mL AlCl<sub>3</sub> 2%, dan ditambahkan 8 mL asam asetat 5% ke dalam larutan. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

**d. Penetapan Kadar**

Sebanyak 20 mg sampel ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL etanol kemudian disentrifuge sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Sebanyak 0,5 mL sampel uji ditambahkan dengan 0,1 mL aluminium (III) klorida 10%, 0,1 mL kalium asetat 1 M dan 2,8 mL air suling. Setelah diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum kuersetin 435 nm. Flavonoid total dari ekstrak etanol 70 % daging buah dan biji pare dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi kuersetin yang telah diukur sebelumnya. Kandungan flavonoid total dinyatakan sebagai jumlah g kuersetin ekuivalen tiap gram ekstrak.

### 3.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari kandungan flavonoid ekstrak etanol serta fraksi N-heksana, etil asetat dan air ekstrak daging dan biji buah pare (*Momordica chrantia* L.) dilakukan menggunakan statistik uji *One Way ANOVA*. Data yang dikumpulkan merupakan data primer hasil uji ekstraksi dan fraksi etanol 70 %. Data yang diperoleh, setelah diedit, dientri ke dalam file komputer dengan program *SPSS 15.0 for Windows*. Setelah dilakukan cleaning, dilakukan analisis statistik.

Data tersebut diuji normalitasnya dengan uji *Saphiro-Wilk* dan didapatkan distribusi data yang normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji statistik parametrik *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*.