

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian bersifat eksperimental yang dilakukan dengan melihat kadar kandungan ekstrak etanol daun jambu biji menggunakan metode Spektrofotometri *UV-Vis* dengan melihat profil KLTnya. Penelitian eksperimental adalah penelitian yang mencari hubungan sebab akibat antara variabel bebas dengan variabel terikat, dimana variabel bebas dikontrol dan dikendalikan untuk dapat menentukan pengaruh yang ditimbulkan pada variabel terikat (Ratminingsih, 2010).

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2023 – Januari 2024 di Laboratorium Kimia Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Sahid Surakarta.

#### **3.2 Populasi dan Sampel**

##### **3.2.1 Populasi**

Populasi adalah sebagai wilayah secara umum yang terdiri atas obyek/subyek yang memiliki kualitas dan karakteristik tertentu yang diterapkan oleh peneliti untuk diteliti lalu dibuat kesimpulannya (Sugiyono, 2018).

Populasi dari penelitian ini adalah daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

##### **3.2.2 Sampel**

Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dipunyai oleh populasi tersebut (Sugiyono, 2018)

Sampel dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

### 3.2 Alat dan Bahan

#### a. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas (*Pyrex*), cawan porselin (China), neraca analitik (*Acis*), baskom plastik (Lokal), toples 2500 L (*Pyrex*), blender (*Maspion*), oven, *waterbath* (*memmert*), pipet tetes (*Pyrex*), Spektrofotometer *UV-Vis* (*Gynesis*) dan *rotary evaporator* (*Bio base*), chamber (*CAMAG<sup>TM</sup>*), UV Lamp (*Gynesis*), mikropipet (*DragonLab*), plat KLT (Silika gel F<sub>254</sub>), tabung reaksi.

#### b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Aquadest (*Merck*), Etil asetat (*Merck*), Kuersetin (*Merck*), Kertas saring (*Whatman*), methanol (*Merck*), Ammonium Klorida (*Merck*), Natrium Asetat (*Merck*), Kalium Asetat (*Merck*), Daun jambu biji (*Psidium guajava* L.), Etanol 96% (*Merck*), Klorform (*Merck*), Asam format (*Merck*), serbuk magnesium, HCl pekat (*Merck*), pereaksi dragendorf, HCl 2N, FeCl<sub>3</sub> 5%, kloroform, anhidra asetat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah poin-poin yang akan menjadi karakteristik suatu penelitian (Ridha, 2017). Dalam penelitian ini ada dua jenis variabel:

#### a. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi perubahan dari variabel terikat (Sugiyono, 2018)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

#### b. Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas (Sugiyono, 2018)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pemeriksaan kualitatif kuersetin dengan melihat profil Kromatografi Lapis Tipis serta Uji kuantitatif kadar kuersetin dengan metode Spektrofotometri *UV-Vis* pada ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

### 3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional yaitu definisi yang membatasi ruang lingkup atau variabel-variabel yang diteliti (Notoatmodjo, 2012). Definisi operasional pada penelitian ini adalah:

- a. Tumbuhan jambu biji (*Psidium guajava* L.) merupakan salah satu tanaman obat-obatan yang sering dimanfaatkan oleh masyarakat. Daun jambu biji memiliki beberapa kandungan kimia yaitu tannin, flavonoid, guajaverin, leukosianidin, minyak atsiri, asam malat, damar, dan asam oksalat (Fратиwi, 2015).
- b. Kromatografi Lapis Tipis merupakan salah satu metode untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam suatu campuran pada lempeng KLT.
- c. Kadar kuersetin adalah besarnya kandungan kuersetin pada ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang dinyatakan sebagai % kadar
- d. Spektrofotometri *UV-Visible* adalah instrumen yang mengukur rasio atau fungsi rasio dari intensitas dua berkas cahaya yang terlihat pada daerah sinar *UV-Vis*. Spektrofotometer *UV-Vis* memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190 nm-380 nm) dan sinar tampak (380 nm-780 nm) (Behera *et al.*, 2012).
- e. Larutan baku kuersetin adalah suatu bahan dengan kemurnian tertentu yang digunakan sebagai pembanding untuk mendapatkan kadar suatu sampel.

## 3.6 Jalannya Penelitian

### 3.6.1 Determinasi Tanaman

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman untuk menetapkan kebenaran yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi pada sampel tanaman jambu biji (*Psidium guajava* L.) secara makroskopis dan dengan acuan buku yang dibuktikan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di Tawangmangu.

### 3.6.2 Penyiapan Simplisia

Penyiapan simplisia meliputi (Prasetyo, 2013):

a. Pengumpulan bahan baku

Pengumpulan bahan baku yang digunakan adalah bagian daun dari tanaman daun jambu biji (*Psidium guajava* 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

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  $30^{\circ}\text{C} - 90^{\circ}\text{C}$  (terbaik  $60^{\circ}\text{C}$ ). Jika bahan aktif tidak tahan panas atau mudah menguap maka pengeringan dilakukan dengan suhu serendah mungkin, misal  $30^{\circ}\text{C} - 45^{\circ}\text{C}$ .

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

Pembuatan ekstrak daun jambu biji dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Simplisia sebanyak 400g dimasukkan kedalam wadah kaca berwarna gelap dan tertutup, di maserasi dengan etanol 96% sampai serbuk simplisia terendam. Diamkan selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Setelah hari ke 3 sampel di saring dan dipisahkan ampas dan filtratnya, selanjutnya ampas diremaserasi dengan pelarut etanol 96% yang baru sampai ampas terendam, dilakukan 2 kali penyaringan. Filtrat dikumpulkan dan dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* dengan suhu  $60^{\circ}\text{C}$  hingga diperoleh ekstrak kental. (Aslamiyah dkk., 2023)

### 3.6.4 Pemeriksaan Kualitatif Kuersetin

#### a. Uji Tabung Flavonoid

Sebanyak 1 mL sampel ditambahkan 0,5 gram serbuk magnesium dan 10 tetes HCl pekat, bila bereaksi positif akan menghasilkan larutan berwarna jingga, merah muda atau merah.

#### b. Profil Kromatografi Lapis Tipis

Larutan uji dilakukan dengan mengambil sebanyak 100 mg ekstrak kental, kemudian dilarutkan dengan etanol 96% dan diencerkan sampai 10 mL pada labu takar. Larutan tersebut disaring dan didapatkan ekstrak daun jambu biji.

Identifikasi senyawa kuersetin yang terkandung dalam ekstrak dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Fase gerak yang digunakan yaitu, (kloroform: etil asetat: asam format 5:4:1) dengan fase diam plat silika gel F<sub>254</sub>. Fase gerak disiapkan sebanyak 10 mL dan didiamkan selama  $\pm$  1 jam. Kemudian larutan standar kuersetin dan ekstrak daun jambu biji ditotolkan pada plat silika gel F<sub>254</sub> masing-masing sebanyak 2  $\mu$ L. Plat dieluasi dengan fase gerak sampai batas. Pengamatan kualitatif kuersetin di bawah sinar UV 254nm dan 366nm menggunakan pereaksi semprot AlCl<sub>3</sub> 5%.

### 3.6.5 Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

Larutan baku kuersetin dibuat dengan melarutkan 10 mg kuersetin dalam pelarut yang sama hingga volume 100 mL. Larutan uji dibuat dengan seri konsentrasi 2; 4; 6; 8; dan 10 ppm dalam labu takar 10 mL kemudian di ad kan menggunakan etanol 96 %

### 3.6.6 Penetapan Kadar Kuersetin Dalam Ekstrak Daun Jambu Biji

Penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak dikuantifikasi menggunakan alat spektrofotometer *UV-Vis*. Larutan sampel dibuat dengan menimbang sebanyak 250 mg yang dilarutkan dalam 50,0 mL etanol 96%. Dari larutan tersebut diencerkan, ambil 0,5 mL

ditambah etanol ad 25,0 mL kemudian diencerkan lagi dengan mengambil 0,25 ditambah etanol ad 25,0 mL. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 258 nm terhadap larutan blanko pelarut. Kadar kuersetin sampel dinyatakan dalam % kadar (Sudjarwo dkk., 2022)

### 3.7 Validasi Metode

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penelitian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Hegar, 2018).

Validasi metode sangat diperlukan karena beberapa alasan yaitu, validasi metode merupakan elemen penting dari kontrol kualitas, validasi membantu memberikan jaminan bahwa pengukuran akan dapat diandalkan. Tujuan utama validasi metode adalah untuk menghasilkan analisis yang paling baik. Untuk memperoleh hasil tersebut, semua variabel yang terkait dengan metode analisis harus dipertimbangkan seperti prosedur pengambilan sampel dan sistem deteksinya. Banyaknya parameter yang harus divalidasi tergantung pada tujuan analisis (Adamovics, 1997).

Uji validasi dapat dibedakan menjadi empat kategori, yaitu kategori satu, metode penetapan kadar komponen utama dalam bahan baku obat atau bahan aktif dalam sediaan farmasi. Kategori dua, metode penetapan cemaran atau hasil degradasi, metode ini termasuk penetapan kuantitatif dan uji batas/kualitatif. Kategori tiga, metode penetapan karakteristik sediaan (disolusi, pelepasan obat, dll). Kategori empat, metode analisis untuk identifikasi (USP 32, 2009).

### 3.8 Analisis Data

#### 1) Validasi Metode

Validasi digunakan untuk mengetahui dan membuktikan metode analisis yang dipakai dapat menghasilkan data yang valid. Pengujian validasi dilakukan dengan beberapa parameter diantaranya selektifitas, linieritas, akurasi, presisi, LOD dan LOQ.

##### a. Linieritas

Dibuat satu seri larutan baku kerja dengan berbagai kadar (2, 4, 6, 8 dan 10 ppm). Masing-masing diukur absorbannya pada panjang gelombang terpilih. Kemudian dibuat kurva baku hubungan antara kadar dengan absorbansi. Berdasarkan absorbansi yang terbaca ( $y$ ), konsentrasi baku kerja ( $x$ ), maka dapat dihitung persamaan garis regresi  $y = bx + a$ . dihitung harga koefisien korelasi ( $r$ ) dan koefisien variasi fungsi ( $V_{x_0}$ ).

##### b. Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung secara statistika melalui persamaan garis linier dari kurva baku, setelah diperoleh data simpangan baku respon analitik dari blanko dan *slope* ( $b$ ) pada persamaan garis linier yaitu  $y = bx + a$ . Sehingga batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung dengan rumus :  $S_b$

$$Q = \frac{k \times S_b}{Sl}$$

Keterangan :

Q : LOD (batas deteksi) atau LOQ (batas kuantitasi)

K : 3 untuk LOD atau 10 untuk LOQ

$S_b$  : simpangan baku absorbansi analit

$Sl$  : *slope* ( $b$ ) pada persamaan garis  $y=bx+a$ )

##### c. Akurasi

Dibuat perlakuan sama seperti pembuatan larutan baku kuersetin 100 ppm yaitu menimbang sampel sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan menggunakan etanol 96 % ad labu ukur

100 mL. Lalu, larutan dibuat konsentrasi 2, 4 dan 6 ppm pada masing-masing sampel dan baku kuersetin dan di ad kan menggunakan etanol 96 % pada labu ukur 10 mL. Kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 258 nm. Persyaratan uji akurasi yang baik yaitu apabila diperoleh nilai % *recovery* 90-107 %. Nilai % *recovery* dapat dihitung dengan rumus :

$$\% Rec = \frac{\text{Kadar yang diperoleh}}{\text{Kadar yang diketahui}} \times 100\%$$

d. Presisi

Dibuat larutan standar kuersetin dengan kadar 2 ppm dan dicukupkan pada volume 10 mL menggunakan etanol 96 %. Dibaca absorbannya pada panjang gelombang maksimum 258 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan sebanyak 6 kali replikasi kemudian dihitung absorbansi rata-rata, standar deviasi (SD), dan koefisien korelasi (KV). Presisi dikatakan memenuhi syarat jika  $KV < 2\%$  dan pada sampel biologi  $KV \leq 15\%$ .

$$SD = \frac{(\sum(x-\bar{x})^2)}{n-1} \quad KV = \frac{SD}{x} \times 100\%$$

2) Analisis Kualitatif Penetapan Kadar Kuersetin

Ekstrak kental dari daun jambu biji dilakukan identifikasi mengandung senyawa kuersetin dengan KLT. Fase diam menggunakan plat silika gel F<sub>254</sub> dan fase gerak kloroform: etil asetat: asam format (5: 4: 1). Pengamatan kualitatif kuersetin di bawah sinar tampak, lampu UV 254nm dan UV 366nm menggunakan pereaksi semprot AlCl<sub>3</sub> 5%.

3) Penetapan Kadar Kuersetin

Kadar kuersetin dihitung berdasarkan dari persamaan *regresi linier* kurva kalibrasi larutan standar kuersetin dari hasil pembacaan alat spektrofotometri *UV-Vis*. Nilai Absorbansi (ppm) dimasukkan ke dalam rumus regresi linier sebagai nilai y, sedangkan nilai x sebagai

konsentrasi kuersetin yang ada pada larutan sampel kerja dan hasil dinyatakan dalam % kadar.

Persamaan *regresi linier* :

$$y = bx + a$$

keterangan :

y = absorbansi

x = konsentrasi sampel

b = koefisien regresi (menyatakan *slope* kemiringan)

a = tetapan regresi (menyatakan intersep)

$$\text{Kadar kuersetin} = \frac{c \times v}{m} \times Fp \times 100\%$$

Keterangan :

c = konsentrasi kuersetin

v = volume ekstrak

Fp = faktor pengenceran

m = berat sampel

Sumber : (Hikmawati, 2019)

Data yang didapatkan setelah pengujian kualitatif dan uji kuantitatif akan disajikan dalam bentuk tabel dan dijelaskan secara deskriptif.