

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian bersifat eksperimental yang dilakukan dengan melihat perbedaan kandungan kimia ekstrak etanol 70% yang ada pada biji dan daging buah pare.

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

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

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

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

Spektrofotometer UV-VIS (*Genesys*), Penguap vakum (Bio Base), Timbangan Analitik (Ohaus), Kertas Perkamen, Beker Glass, Blender, Aluminium foil dan alat-alat gelas (pyrex).

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

Buah Pare (*Momordica charantia L*), Etanol, Heksan, Aseton, Aqua Destilata, Ferri (III) Klorida, Kloroform, Serbuk magnesium (mg), Asam klorida, Amoniak (Merch), Metanol, Aluminium klorida, dan Kuersetin

(Sigma Aldrich), bouchardat LP, Mayer LP.

### **3.4 Identifikasi Variabel Penelitian**

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

#### **a. Variabel Independen**

Variabel Independen yang juga sering disebut sebagai variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebuah sebab perubahan atau timbulnya Variabel Dependen (terikat). Adapun Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol 70% pada biji dan daging buah pare.

#### **b. Variabel Dependen**

Variabel Dependen (terikat) merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, adanya Variabel Bebas. Adapun Variabel Terikat pada penelitian ini adalah kandungan alkaloid dan flavonoid.

### **3.4 Definisi Operasional**

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

- a. Ekstrak etanol 70% biji dan daging buah pare adalah simplisia kering dari biji dan daging buah pare yang diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan etanol 70%.

- b. Uji kualitatif senyawa kimia ekstrak etanol 70% pada biji dan daging buah pare menggunakan reaksi tabung. Uji kualitatif yang dilakukan yaitu uji fenol, uji tanin, uji flavonoid dan uji alkaloid.
- c. Uji kuantitatif dilakukan untuk menghitung perbedaan kandungan flavonoid dan alkaloid pada ekstrak etanol 70% biji dan daging buah pare.
- d. Uji kuantitatif senyawa flavonoid ekstrak etanol 70% pada biji dan daging buah pare menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis.
- e. Uji kuantitatif senyawa alkaloid ekstrak etanol 70% pada biji dan daging buah pare menggunakan metode gravimetri.

### **3.5 Jalannya Penelitian**

#### **3.5.1 Determinasi Tanaman**

Determinasi tanaman dilakukan di UPT-Laboratorium Universitas Setia Budi. Jalan Letjen Sutoyo, Mojongsongo, Kecamatan Jebres, Kota Surakarta Jawa Tengah 57127.

#### **3.5.2 Penyiapan Sampel Simplisia**

- a. Pengumpulan bahan baku (Prasetyo, 2013)

Sebanyak 80 kg buah pare dan 1 kilo biji buah pare diperoleh dari Aspakusa Makmur Boyolali

- b. Sortasi Basah

Biji dan daging bu pare yang telah diperoleh dilakukan sortasi basa dengan cara dicuci menggunakan air yang mengalir untuk memisahkan benda asing dari sampel.

c. Pencucian

Pencucian sampel biji dan daging buah pare menggunakan air yang mengalir.

d. Perajangan

Perajangan daging buah pare dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, dengan memperkecil ukuran sampel.

e. Pengeringan

Pengeringan sampel simplisia biji dan daging buah pare menggunakan oven dan matahari. Pengeringan menggunakan oven dilakukan pada suhu 30-90°C.

f. Sortasi kering

Sortasi kering pada sampel biji dan daging buah pare dilakukan dengan memisahkan antara benda asing pada sampel simplisia kering.

### **3.5.3 Ekstraksi Sampel**

Sebanyak 1 kg sampel biji dan daging buah pare kering diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Biji dan daging buah

dimasukkan kedalam wadah maserasi dan diekstraksi dengan etanol 70% hingga sampel terendam sempurna, lalu disimpan 1x24 jam dalam wadah tertutup dan terlindungi dari cahaya matahari langsung, Sampel disaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh filtrat. Hingga menghasilkan ekstrak 74,35 gram berwarna kuning kecoklatan dengan viskositas yang tinggi (kental), sampel diaduk pada jam keenam setelah penyimpanan. Residu dimaserasi kembali dengan cairan penyaring etanol 70% yang baru. Dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali. Dari rendemen ekstrak dan susut pengeringan dapat dihitung dosis konversi pare jika digunakan pada manusia. Filtrat yang diperoleh, dikumpulkan dan diuapkan dengan rotary evaporator hingga didapatkan ekstrak kental (Pratiwi, dkk, 2019).

#### **3.5.4 Analisis Kualitatif**

Analisis kualitatif dari ekstrak buah pare antara lain :

a. Uji Fenol

Tes Ferri Klorida, 2 tetes ekstrak, ditambahkan 3-4 tetes besi (III) klorida. Senyawa fenol akan memberikan warna hijau hingga biru hitam dengan penambahan larutan garam (III) besi klorida (Hanani, 2017).

b. Uji Tanin

Tes Ferri Klorida, 3 tetes ekstrak ditambahkan 3-4 tetes besi (III) klorida. Senyawa tannin akan memberikan warna hijau hingga kecoklatan dengan penambahan larutan garam besi (III) klorida (Hanani, 2017).

c. Uji Flavonoid

Ekstrak 1 ml ditambahkan 2 ml etanol, ditambahkan 0,5 g serbuk seng dan 2 ml asam klorida 2 N, diamkan selama 1 menit, tambahkan 10 tetes asam klorida pekat, jika dalam waktu 2 sampai 5 menit terjadi warna merah, kuning, atau jingga, maka menunjukkan adanya flavonoid (Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995)

d. Uji Alkaloid

Tambah ekstrak 5 mL, lalu ditambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL air, panaskan diatas penangas air selama 2 menit, dinginkan dan saring. Pindahkan 3 tetes filtrat pada kaca arloji, tambahkan 2 tetes *Bouchardat LP*. Jika pada kedua percobaan tidak mengandung alkaloid. Jika dengan mayer LP terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning dan dengan bouchardai LP terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam, maka ekstrak mengandung alkaloid (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995).

### 3.5.5 Analisis Kuantitatif

Setelah di lakukan analisis kualitatif pada ekstrak etanol 70% biji dan daging buah pare dengan, maka diperoleh hal positif yaitu flavonoid dan alkaloid. Langkah selanjutnya yaitu analisis kuantitatif guna memperoleh kadar dari masing-masing kandungan senyawa tersebut.

a. **Flavonoid**

1) Pembuatan Larutan Induk (Kuersetin 100 ppm)

Pembuatan larutan induk dilakukan dengan kuersetin sebanyak 10,0 mg dilarutkan dalam labu takar 100 mL dengan pelarut etanol 70% hingga tanda (kadar kuersetin menjadi 1 mg/mL atau 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Lalu larutan induk 1000  $\mu\text{g/mL}$  diambil sebanyak 1 mL dilarutkan dalam labu takar 10 mL dengan pelarut etanol 70% hingga tanda (kadar kuersetin menjadi 100  $\mu\text{g/ml}$ ).

2) Pembuatan larutan seri standar kuersetin

Pembuatan larutan standar dengan cara larutan induk dipipet sebanyak 100; 200; 300; 400; dan 500 mL masing-masing kedalam labu ukur 10 mL menggunakan mikropipet. Volumennya dicukupkan dengan etanol 70% sampai tanda batas 10 mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm.

3) Pembuatan larutan blanko

Pembuatan larutan blanko menggunakan etanol 70% sebanyak 1 mL, kalium klorida 100 mL,  $\text{AlCl}_3$  100 mL dan di cukupkan dengan aquades kedalam labu ukur 10 mL menggunakan mikropipet.

4) Penentuan panjang gelombang serapan maksimum

Penentuan panjang gelombang serapan maksimum dilakukan dengan cara larutan standar (1 ppm) dipipet 100 mL kedalam labu ukur 10 mL. Etanol 70% ditambahkan sebanyak 1 mL, kalium klorida sebanyak 100 mL,  $\text{AlCl}_3$  sebanyak 100 mL menggunakan mikropipet

dan ditambahkan dengan aquadest sampai tanda batas 10 mL, dikocok sampai homogen. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 400-600 nm dengan spektrofotometer *UV-Vis*.

5) Pembuatan kurva kalibrasi

Panjang gelombang maksimum diperoleh kemudian dilakukan pembuatan kurva kalibrasi dengan cara larutan standar 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dipipet sebanyak 100, 200, 300, 400, dan 500  $\mu$ L menggunakan mikropipet, dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan 100  $\mu$ L  $AlCl_3$ , 100  $\mu$ L kalium klorida, 1 mL alkohol 70% dan dicukupkan dengan aquadest sampai tanda batas 10 mL, dikocok sampai dengan homogen. Kemudian serapan diukur dengan spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum.

6) Pembuatan larutan ekstrak

Sebanyak 10,0 mg ekstrak cair biji dan daging buah pare dilarutkan dalam labu takar 10 mL dengan pelarut etanol 70% hingga tanda (kadar ekstrak biji dan daging buah pare menjadi 1 mg/mL atau 1000  $\mu$ g/mL). Lalu larutan ekstrak biji dan daging buah pare 1000  $\mu$ g/mL diambil sebanyak 1 mL dilarutkan dalam labu takar 10 mL dengan pelarut etanol 70% hingga tanda (kadar ekstrak menjadi 100  $\mu$ g/mL). Lalu ekstrak biji dan daging buah pare dipipet sebanyak 600  $\mu$ L dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan 100  $\mu$ L  $AlCl_3$ , 100  $\mu$ L kalium klorida, 1 mL alkohol 70% dan di addkan

dengan aquadest sampai tanda batas 10 mL. Diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang 400-600 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. (Chang C, *et al.*,2002).

#### **b. Alkaloid**

Sebanyak 20 mL sampel ekstrak cair dilarutkan dengan 100 mL methanol P dan 10 mL amoniak P, kemudian dipanaskan diatas penangas air selama 30 menit. Penyarian diulangi sebanyak 2 kali menggunakan jenis dan pelarut yang sama. Ditambahkan 50 mL asam klorida 1 N LP pada kumpulan filtrat, diuapkan hingga volume kurang dari 25 mL, saring kedalam corong pisah. Filtrat dibasakan dengan amoniak P sampai  $\text{pH} \pm 10$ , disari 3 kali dengan 25 mL kloroform. Fase kloroform dikumpulkan dan diuapkan pada suhu 50 °C, kemudian dikeringkan pada suhu 100 °C hingga bobot tetap. Sisa pengeringan dihitung sebagai alkaloid total (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008).

### **3.7 Analisis Data**

Data yang diperoleh dari pengujian kadar senyawa alkaloid dan flavonoid ekstrak etanol biji dan daging buah pare dilakukan dengan analisis Statistik *Uji T-Test*. Data yang dikumpulkan merupakan data primer yaitu data kadar dari flavonoid dan alkaloid dari data yang telah dihitung. Data yang diperoleh, setelah diedit dan dikoding, dientri kedalam file komputer dengan program SPSS 15.0 for Windows. Setelah dilakukan cleaning, dilakukan analisis statistik.

Data tersebut diuji normalitasnya dengan uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* untuk mengetahui persebaran data yang di lakukan normal atau tidak.

