# BAB III

# METODOLOGI PENELITIAN

## 3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratoriumJenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental. Penelitian ini meliputi pengumpulan bahan tumbuhan, pengolahan sampel, pembuatan ekstrak kayu Kuning, Identifikasi Fenolik, Pembuatan larutan baku asam galat , Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat, Pembuatan kurva kalibrasi asam galat , Pembuatan kurva standar asam galat , Pembuatan larutan induk ekstrak kayu kuning , Pembuatan larutan ekstrak kayu kuning , Penentuan kadar fenolik kayu kuning, Penentuan kadar fenolik total ekstrak kayu kuning.

### 3.1.1 VariabelPenelitian

Variabel bebas yaitu ekstrak methanol kayu kuning (*Arcangelisia flava L.*) dengan konsentrasi 50%, 70%, dan 99,8%. Variabel terikat yaitu penentuan kadar fenolik total ekstrak kayu kuning

### 3.1.2 ParameterPenelitian

Parameter yang digunakan pada penelitian ini yaitu untuk mengidentifikasi alakaloid pada kayu kuning , Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat pada kayu kuning, Penentuan kadar fenolik total ekstrak kayu kuning

## 3.2 Lokasi dan Jadwal Penelitian

### 3.2.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara (UMN) Al-Washliyah Medan**.**

### 3.2.2 Jadwal Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Februari-Juni 2023

## 3.3 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi: Kayu kuning, aquades, metanol p.a, alfa naftol, alumunium klorida, ammonia, asam asetat anhidrida, asam asetat glasial, asam klorida, asam nitrat, asam sulfat, aseton, benzen, amil alkohol, besi (III) klorida, bismut (III) nitrat, karboksil metil selulose natrium, iodium, isopropanol, kalium hidroksida, kalium iodida, kloroform, kupri sulfat, magnesium serbuk, metanol, natrium hidroksida, raksa (II) klorida, seng serbuk, timbal (II) asetat, Na2CO3 7,5 %, reagen folin ciocalteu, asam galat, aluminium klorida 10%, natrium asetat 1M.

## 3.4 Peralatan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat maserasi, *rotary evaporator*, kapas, tisu, botol berwarna gelap, aluminium foil, timbangan analitik, pipet tetes, gelas ukur, erlenmeyer, seperangkat alat spektrofotometer uv-visible dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

**3.5 Penyiapan Sampel**

### 3.5.1 Pengambilan Sampel Tumbuhan

Sampel kayu kuning yang digunakan pada penelitian ini di peroleh di Kota Samarkilang Kec. Syiah Utama Kab. Bener Meriah Metode pengambilan dilakukan dengan cara *purposive*, Sampel diambil pada satu tempat atau daerah saja tidak membandingkannya dengan daerah lain.

### 3.5.2 Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan oleh Herbarium Medanense (MEDA) Universitas Sumatera Utara terhadap Batang Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr.) yang diteliti.

### 3.5.3 Pengolahan simplisia

Sampel kayu kuning (*Arcangelisia flava* (L*.*) Merr*.*) yang masih segar dikumpulkan disortasi basah untuk memisahkan cemaran (kotoran dan bahan asing lain) dari bahan simplisia, dirajang dan ditimbang berat basahnya 3000 g. Kemudian dikeringkan pada suhu ruang hingga kering dan dilakukan sortasi kering yaitu membuang benda-benda asing yang tertinggal pada simplisia. Kemudian ditimbang berat keringnya, dihaluskan dengan blender dan disimpan di dalam wadah yang tertutup rapat.

## 3.6 Karakterisasi Simplisia

### 3.6.1 Pemeriksaan Makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap tumbuhan segar Kayu Kuning (*Arcanelisia flava* (L.)Merr*.*) dengan cara memperhatikan warna, bentuk, dan ukuran.

### 3.6.2 Pemeriksaan Mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia Kayu Kuning (*Arcanelisia flava* (L.)Merr*.*) dengan cara sampel serbuk kayu kuning diletakkan diatas kaca objek, lalu ditetesi dengan kloralhidrat ditutup dengan cover glass, lakukan viksasi sampai jernih kemudian diamati dibawah mikroskop.

### 3.6.3 Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode Azeotropi. Alat terdiri dari labu alas bulat 500 ml, alat penampung dan pendingin, tabung penyambung dan penerima 10 ml.

Cara kerja

1. Penjenuhan toluene

Sebanyak 200 ml toluen dan 2 ml aquades dimasukkan ke dalam labu alas bulat, dipasang alat penampung dan pendingin, kemudian didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama 30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 ml.

1. Penetapan kadar air simplisia

Sebanyak 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam labu yang berisi toluen jenuh tersebut, lalu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, kemudian kecepatan destilasi dinaikkan sampai 4 tetes tiap detik. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluen. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0,05 ml. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen (v/b) (Depkes RI, 1995).

% Kadar air simplisia = × 100 %

### 

### 3.6.4Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air

Sebanyak 5 g serbuk simplisia dimaserasi dengan 100 ml kloroforom P (2,5 mL kloroforom dalam 1000 mL aquadest) selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Disaring cepat, 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata (yang telah ditara) di atas penangas air hingga kering, sisa dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes, 1989).

% Kadar sari larut dalam air = × × 100 %

### 3.6.5 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol (96%) dalam labu tersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol, kemudian diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan penguap berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105ºC hingga bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 96% dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 1979).

% Kadar sari larut dalam etanol = × × 100 %

### 3.6.6 Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 2g serbuk dimasukkan kedalam krus porselin yang telah dipijarkan dan ditara kemudian krus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, pemijaran dilakukan pada suhu 500-600°c selama 3 jam kemudiaan didinginkan dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Ditjen POM, 1979).

% Kadar abu total = ×100 %

### 3.6.7 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, didinginkan dengan 25 ml asam klorida encer selama 5 menit, sebagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, kemudian dicuci dengan air panas, residu dengan kertas saring dipijarkan sampai bobot tetap, kemudiaan didinginkan dan ditimbang. Kadar abu tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Ditjen POM, 1979).

% Kadar abu tidak larut dalam asam = ×100 %

## 3.7 Pembuatan Larutan Pereaksi

### 3.7.1 Larutan Pereaksi Bouchardat

Sebanyak 4 g kalium iodida dilarutkan dalam 20 mL aquades, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit 2 g iodium dan dicukupkan dengan air aquades hingga 100 mL (Ditjen POM, 1979).

### 3.7.2 Larutan Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 g raksa (II) klorida, dilarutkan dalam 60 ml aquades, kemudian pada wadah yang lain ditimbang sebanyak 5 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 10 mL air suling. Kedua larutan dicampurkan dan ditambahkan air suling hingga diperoleh larutan 100 mL (Ditjen POM, 1979).

### 3.7.3 Larutan Pereaksi Dragendorff

Sebanyak 8 g bismut (II) nitrat ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 20 mL asam nitrat pekat. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 27,2 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 50 mL air suling. Kemudian kedua larutan dicamurkan dan didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan air suling hingga 100 mL (Ditjen POM, 1979).

### 3.7.4 Larutan Pereaksi Molish

Sebanyak 3 gram alfa-naftol ditambahkan beberapa tetes etanol kemudian dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga 100 ml (Ditjen POM, 1979).

### 3.7.5 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2 N

Sebanyak 17 mL asam klorida pekat diencerkan dalam aquades hingga 100 ml (Ditjen POM, 1979).

### 3.7.6 Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2N

Sebanyak 5,4 mL asam sulfat pekat diencerkan dengan aquades hingga 100 mL (Ditjen POM, 1979).

### 3.7.7 Larutan Pereaksi Natrium Hidroksida 2 N

Sebanyak 8,002 gram pellet natrium hidroksida dilarutkan dalam aquades hingga 100 mL (Ditjen POM, 1979).

### 3.7.8 Larutan Pereaksi Lieberman-Burchard

Sebanyak 20 bagian asam asetat anhidrat dicampurkan dengan 1 bagian asam sulfat pekat dan 50 bagian kloroform. Larutan pereaksi harus dibuat baru. (Ditjen POM, 1979).

### 3.7.9 Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%

Sebanyak 1 gram besi (III) klorida dilarutkan dengan aquades hingga 100 mL (Ditjen POM, 1979).

### 3.7.10 Larutan Pereaksi Timbal (II) asetat 0,4 M

Sebanyak 15,17 g timbal (II) asetat dilarutkan dalam aquades bebas karbondioksida hingga 100 mL (Ditjen POM, 1979).

## 3.8 Pembuatan Ekstrak Metanol Kayu Kuning

Sebanyak 10 bagian simplisia dimasukan dalam bejana, tuang dengan 75 bagian Metanol 99,8 %, 70%, dan 50% tutup dan diamkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, peras dan cuci ampas dengan Metanol 99,8%, 70%, dan 50% secukupnya hingga dieproleh 100 bagian. Pindahkan dalam bejana tertutup, biarkan ditempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari, kemudian disaring. Maserat I dan maserat II digabungkan setelah itu dipekatkan dengan cara diuapkan pada rotary evaporator dengan suhu tidak lebih dari 50o C hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1979).

## 3.9 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia Kayu Kuning (*Arcanelisia flava* (L.)Merr*.*), meliputi pemeriksaan senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, steroida, triterpenoid, saponin dan glikosida. Skrining fitokimia dilakukan terhadap ekstrak metanol Kayu Kuning (*Arcanelisia flava* (L.)Merr*.*) (Depkes RI, 1980).

### 3.9.1 Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak metanol Kayu Kuning (*Arcanelisia flava* (L.)Merr*.*) masing-masing ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 mL asam klorida dan 9 mL aquades, dipanaskan air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut:

1. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer.
2. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes peraksi Bourchardat.
3. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff.

Alkaloida dianggap positiff jika terjadi endapan atau paling sedikit dua atau tiga dari percobaan diatas (Depkes RI, 1989).

### 3.9.2 Pemeriksaan Flavonoid

Ekstrak metanol Kayu Kuning (*Arcanelisia flava* (L.)Merr*.*)masing-masing 10 g ditimbang kemudian ditambahkan 100 mL air panas, didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, filrat yang diperoleh kemudian diambil 5 mL lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil akolhol, dikocok, dan dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1989).

### 3.9.3 Pemeriksaan Fenolik

Ekstrak metanol Kayu Kuning (*Arcanelisia flava* (L.)Merr*.*)masing-masing ditimbang 0,5 g sampel disari dengan 10 mL aquades, lalu filtratnya diencerkan dengan aquades sampai tidak bewarna. Diambil 2 mL larutan lalu ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Terjadi warna biru atau hijau kehitaman menununjukkan adanya fenolik (Depkes RI, 1989).

### 3.9.4 Pemeriksaan Tanin

Ekstrak metanol Kayu Kuning (*Arcanelisia flava* (L.)Merr*.*)masing-masing ditimbang 0,5 g sampel disari dengan 10 mL aquades, lalu filtratnya diencerkan dengan aquades sampai tidak bewarna. Diambil 2 mL larutan lalu ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Terjadi warna biru atau hijau kehitaman menununjukkan adanya tanin (Depkes RI, 1989).

### 3.9.5 Pemeriksaan Saponin

Ekstrak metanol Kayu Kuning (*Arcanelisia flava* (L.)Merr*.*)masing-masing ditimbang sebanyak 0,5 g sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan aquades panas sebanyak 10 mL, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, timbul busa yang mantap tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Ditambahkan 1 tetes larutan asam klorida 2 N, bila buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1989).

### 3.9.6 Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Ekstrak metanol Kayu Kuning (*Arcanelisia flava* (L.)Merr*.*)masing-masing ditimbang sebanyak 1 g sampel di maserasi dengan 20 mL *n*-heksana selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap. Pada sisa ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Timbul warna ungu merah menunjukkan adanya triterpenoida atau warna hijau menunjukkan adanya steroida (Depkes RI, 1989).

### 3.9.7 Pemeriksaan Glikosida

Serbuk simplisia dan ekstrak sebanyak 3g ditimbang dan dsaring dengan 30 ml campuran etanol 96% dengan air (7:3) dan 10 ml H2SO4 2N direfluks selama 2 jam lalu didinginkan dan saring. Pada 20 ml fitrat ditambahkan masing – masing 25 ml air dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4 N dikocok dan diamkan selama 5 menit lalu di saring. Filtrat disaring dengan 20 ml campuran isopropanol dan kloroform (2:3) lakukan berulang sebanyak 3 kali. Sari dikumpulkan lalu diuapkan pada temprature tidak lebih drai 59°c sisanya dilarutkan dalam 2 ml metanol

Larutan sisa digunakan untuk percobaan berikutnya dengan cara diambil senayak 0,1 ml larutan percobaan dimasukan dalam tabung reaksi dan diuapkan diatas penangas air. Pada sisanya ditambahkan 2 ml air suling dan ditambah 5 tetes perekasi molish, lalu secara perlahan ditambahkan 2 ml asam sulfat pekat. Glikosida positif ditandai dengan terbentukny cincin berwarna ungu pada batas cairan (Depkes RI, 1989)

## 3.10 Penetapan Kadar Fenolik Total

### 3.10.1 Pembuatan Larutan Asam Galat

Ditimbang 10 mg asam galat, dalam labu tentu ukur 100 ml ditambah 0,5 ml etanol p.a. kemudian larutan diencerkan dengan air suling sampai volume 100 ml atau sampai tanda batas larutan Induk Baku (C= 100 µg/ml) LIB I..

### 3.10.2 Pembuatan Larutan Na2CO3 7,5%

Ditimbang sebanyak 3,75 g Na2CO3 ditambah 40 ml air suling, kemudian didihkan diatas hotplate sampai serbuk Na2CO3 larut sempurna. Setelah itu diamkan selama 24 jam, saring dan ecerkan dengan air suling sampai volume 50 ml

### 3.10.3 Pembuatan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Dipipet 0,3 mL dari larutan asam galat 100 ppm (LIB I) masukan kedalam labu terukur 10 mL, lalu ditambahkan 0,4 mL reagen *folin ciocalteu*, dikocok dan biarkan 4 – 8 menit. Ditambahkan 4 mL Na2CO37,5% kocok hingga homogen, kemudian cukupkan dengan air suling hingga 10 mL dan didiamkan selama 2 jam. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 400-800 nm (Ahmad *et al.*, 2015).

### 3.10.4 Pembuatan *Operating Time*

Dipipet 0,3 mL dari larutan asam galat 100 ppm (LIB I) masukan kedalam labu terukur 10 mL, lalu ditambahkan 0,4 mL reagen *folin ciocalteu*, dikocok dan biarkan 4 – 8 menit. Ditambahkan 4 mL Na2CO3 7,5% kocok hingga homogen, kemudian cukupkan dengan air suling hingga 10 mL, lalu diukur *operating time* selama 60 menit pada panjang gelombang 400-800 nm.

### 3.10.5 Pengukuran Kurva Kalibrasi Asam Galat

Dipipet 0,1 ml, 0, 2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, dan 0,5 ml dari larutan standar asam galat 100 ppm kedakam labu tentu ukur 10 ml, konsentrasi 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml dan 5 µg/ml lalu tambahkan 0,4 mlreagen *folin ciocalteu*, dikocok dan biarkan selama 4 – 8 menit. Ditambahkan 4 ml Na2CO37,5% kocok hingga homogen, kemudian cukupkan dengan air suling hingga 10 ml. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 400-800 nm (Ahmad *et al.*, 2017).

### 3.10.6 Penetapan Kadar Fenolik Total dari Ekstrak Metanol Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr.)

Penentuan kadar fenolik total pada ekstrak metanol kayu kuning (*Arcangelisia flava* (L)Merr.) merujuk pada prosedur Chun dkk*.,* (2003) yaitu dibuat dengan cara menimbang 10 mg ekstrak metanol kayu kuning 99,8%, 70% dan 50% kemudian dilarutkan dengan 10 ml etanol p.a dan dihomogenkan. Dipipet 1 ml dari larutan tersebut, kemudian ditambahkan dengan 0,4 ml reagen *Folin Ciocalteau* dikocok dan dibiarkan 4-8 menit tambahkan 4,0 ml larutan Na2CO3 3,75% kocok hingga homogen. Dicukupkan dengan air suling hingga 10 ml dan diamkan selama 2 jam pada suhu ruangan.

### 3.10.7 Perhitungan Kadar Fenolik

Kadar total fenolik ekstrak metanol kayu kuning (*Arcangelisia flava* (L)Merr.) dapat dihitung dengan mendistribusikan nilai absorbansi sampel kedalam persamaan garis regresi linear yang didapat pada kurva kalibrasi untuk mendapatkan konsentrasinya. Nilai konsentasi sampel yang didapat kemudian didistribusikan lagi kedalam rumus perhitungan sebagai berikut (Geissman, 1962):

Kadar (µg/g) = C×V×Fp

W

Keterangan :

C = Konsentrasi senyawa dalam larutan sampel (µg/ml)

V = Volume larutan sampel (ml)

Fp = Faktor Pengenceran

W = Berat sampel (g)