# **BAB III**

# **METODE PENELITIAN**

* 1. **Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian eskperimental yang dilakukan di laboratorium farmasi terpadu UMN-Alwashliyah.Rancangan penelitian ini meliputi pengumpulan dan pengolahan sampel, karakteristik simplisia, pembuatan ekstrak etanol dan ekstrak etil asetat daun sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.), skrining fitokimia, dan penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol dan ekstrak etil asetat daun sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.)dengan metode Spektrofotometri *Visible.*

* + 1. **Variabel Penelitian**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dan ekstrak etil asetatdaun sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.) sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol dan ekstrak etil asetatdaun Sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.).

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter penelitian ini menggunakan uji laboratorium secara Spektrofotometri UV-Visible, meliputi cara pembuatan kurva kalibrasi kuersetin dan preparasi sampel.

* 1. **Jadwal dan Lokasi Penelitian**
     1. **Jadwal Penelitian**

Rencana penelitian dilakukan pada bulan Januari-Mei 2024.

* + 1. **Lokasi Penelitian**

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

* 1. **Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan meliputi: daun sambung nyawa, etanol 70%, etil asetat, asam asetat anhidrida, asam nitrat, asam sulfat, amil alkohol, besi (III) klorida, bismut (III) nitrat, iodium, kalium iodida, serbuk magnesium, raksa (II) klorida, alfa-nafthol, timbal (II) asetat, toluene, kloroform, *n*-heksana, aquadest, asam klorida, kuersetin, aluminium klorida, dan natrium asetat.

* 1. **Peralatan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat destilasi, rotary evaporator, tisu, botol berwarna gelap, aluminium foil, timbangan analitik, pipet tetes, gelas ukur, erlenmeyer, seperangkat alat spektrofotometri UV-Vis, hot plate, oven, tanur, dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

* 1. **Penyiapan Sampel**

### 3.5.1 Pengambilan Sampel Tumbuhan

Sampel daun sambung nyawa yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Gohor lama, Langkat, Sumatra utara.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 Daun Sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.)yang diteliti.

* + 1. **Pengolahan Simplisia**

Sampel daun sambung nyawa yang masih segar dikumpulkan disortasi basah untuk memisahkan cemaran (kotoran dan bahan asing lain) dari bahan simplisia dan ditimbang berat basahnya. Kemudian dikeringkan di dalam lemari pengering hingga kering dan dilakukan sortasi kering yaitu membuang benda-benda asing yang tertinggal pada simplisia.Kemudian ditimbang berat keringnya, dihaluskan dengan blender dan kemudian diayak dan siap untuk diekstraksi dengan metode maserasi.

* 1. **Karakterisasi Simplisia**

### 3.6.1 Pemeriksaan Makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap tumbuhan segar daun sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.)dengan cara memperhatikan warna, bentuk, bau dan ukuran.

**3.6.2 Pemeriksaan Mikroskopik**

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.)Serbuk simplisia ditaburkan diatas kaca objek dan dibasahi dengan larutan kloralhidrat lalu ditutup dengan kaca penutup, kemudian di fiksasi dan diamati dibawah mikroskop (Handayani et al., 2019).

### 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 sebagian 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).

Perhitungan:

% Kadar air =

Keterangan:

W = bobot cuplikan, dalam gram

V = volume air yang dibaca pada alat destilasi Azeotrop, dalam ml (BSN, 1992).

### 3.6.4 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air

Sebanyak 5 g serbuk simplisia dimaserasi dengan 100 ml kloroform P (2,5 ml kloroform dalam 100 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 (Gurning, 2020).

Perhitungan :

% Kadar sari larut dalam air =× 100%

Keterangan :

W = bobot cuplikan, dalam gram

W1 = bobot cawan kosong, dalam gram

W2 = bobot cawan + cuplikan setelah dikeringkan, dalam gram

FP = Faktor Pengenceran (Depkes RI, 2000).

### 3.6.5 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia masing-masing 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 105°C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 96% dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1995).

Perhitungan :

% Kadar sari larut dalam etanol = × 100%

Keterangan :

W = bobot cuplikan, dalam gram

W1 = bobot cawan kosong, dalam gram

W2 = bobot cawan + cuplikan setelah dikeringkan, dalam gram

FP = Faktor Pengenceran (Depkes RI, 2000).

### 3.6.5 Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 2 g 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 kemudian didinginkan dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Gurning, 2020).

Perhitungan :

% Kadar abu total =

Keterangan :

W = bobot contoh sebelum diabukan, dalam gram

W1 = bobot contoh + cawan sesudah diabukan, dalam gram

W2 = bobot cawan kosong, dalam gram (BSN, 1992).

### 3.6.6 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dipanaskan dengan 25 ml asam klorida 2 N 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, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Gurning,2020).

Perhitungan :

% Kadar abu tidak larut dalam asam =

Keterangan :

W = bobot cuplikan, dalam gram

W1 = bobot cawan + abu dalam gram

W2 = bobot cawan kosong, dalam gram (BSN, 1992).

* 1. **Pembuatan Larutan Pereaksi**

### 3.7.1 Larutan Pereaksi Boucardat

Sebanyak 4 g kalium iodida dilarutkan dalam 20 ml aquadest, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit 2 g iodium dan dicukupkan dengan aquadest hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

### 3.7.2 Larutan Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 g raksa (II) klorida, dilarutkan dalam 60 ml aquadest, 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 (Depkes RI, 1995).

### 3.7.3 Larutan Pereaksi Dragendroff

Sebanyak 8 g bismuth (II) nitrat ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 20 ml asam nitrat pekat. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 27,2 g kalium iodide lalu dilarutkan dalam 50 ml air suling. Kemudian kedua larutan dicampurkan dan didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995)

### 3.7.4 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2 N

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat diencerkan dalam air suling hingga 100ml(Depkes RI, 1995).

### 3.7.5 Larutan pereaksi Asam sulfat 2 N

Sebanyak 5,4 ml asam sulfat pekat diencerkan dengan air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

### 3.7.6 Larutan Pereaksi Lieberman-Burchard

Sebanyak 20 bagian asam asetat anhidrida dicampurkan dengan 1 bagian asam sulfat pekat(Depkes RI, 1995).

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

Sebanyak 1 g besi (III) klorida dilarutkan dengan air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

### 3.7.8 Larutan Pereaksi Molish

Sebanyak 3 g alfa-naftol ditambahkan beberapa tetes etanol kemudian dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga 100 ml(Depkes RI, 1995).

### 3.7.9 Larutan Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4 M

Sebanyak 15,17 g timbal (II) asetat dilarutkan dalam air suling bebas CO2 hingga volume 100 ml (Depkes RI, 1995).

* 1. **Pembuatan Ekstrak Etanol dan Ekstrak Etil Asetat Daun Sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.)**

Pembuatan ekstrak serbuk daun sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.)dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam bejana, masing-masing dituangi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3750 ml, dan etil asetatsebanyak 3750 ml, didiamkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk, lalu di peras sehingga diperoleh maserat I. Kemudian masing-masing ampas yang diperoleh dibilas dengan etanol 70% sebanyak 1250 ml dan ekstrak etil asetat sebanyak 1250 ml, pindahkan kedalam satu bejana tertutup (maserat I dan maserat II) biarkan ditempat yang sejuk terlindung dari cahaya matahari selama 2 hari, kemudian enap tuangkan atau disaring sehingga diperoleh hasil maserat, lalu dipekatkan dengan cara diuapkan pada *rotary evaporator* dengan suhu tidak lebih dari 50 ºC hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1979).

* 1. **Skrining Fitokimia**

Skrining fitokimia daun sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.) meliputi pemeriksaan senyawaalkaloid, flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid/steroid, glikosida. Skrining fitokimia dilakukan terhadap simplisia, ekstrak etanol, dan ekstrak etil asetat daun sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.).

### 3.9.1 Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5gram kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida dan 9 ml aquadest, dipanaskan air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut: Diambil 3 tetes filtrat, masukkan ke dalam masing-masing 3 tabung reaksi (Depkes RI, 1995).

1. Tabung Reaksi I

Ambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer menghasilkan endapan putih/kuning.

1. Tabung Reaksi II

Ambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi bouchardat menghasilkan endapan coklat kehitaman.

1. Tabung Reaksi III

Ambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi dragendroff menghasilkan endapan merah bata atau jingga kecoklatan

### 3.9.2 Pemeriksaan Flavonoid

Ditimbang sebanyak 0,5 g ekstrak etanol, ektrak etil asetat dan serbuk sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr)ditambahkan 10ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, kedalam 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoida positif jika terjadi warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol(Depkes RI, 1995).

### 3.9.3 Pemeriksaan Tanin

Ditimbang sebanyak 0,5 g ekstrak etanol, ektrak etil asetat dan serbuk sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.)dididihkan selama 3 menit dalam 10ml air suling lalu didinginkan dan disaring. larutan diambil 2 ml ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin(Depkes RI, 1995)

### 3.9.4 Pemeriksaan Saponin

Ditimbang sebanyak 0,5 g ekstrak etanol, ektrak etil asetat dan serbuk sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.)dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air panas, dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil dan tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1979).

### 3.9.5 Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Ditimbang sebanyak 1 g ekstrak etanol, ektrak etil asetat dan serbuk sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.)dimaserasi selama 2 jam dengan 20 ml n-heksan, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap.Pada sisa ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchad.Timbulnya warna biru atau biru hijau menunjukkan adanya steroida, sedangkan warna merah, merah muda atau ungu menunjukkan adanya triterpenoida(Harbone, 1987).

### 3.9.6 Pemeriksaan Glikosida

Ditimbang sebanyak 3 g ekstrak etanol, ektrak etil asetat dan serbuk sambung nyawa*(Gynura procumbens*(Lour.) Merr.)kemudian disari dengan 30 ml campuran 7 ml bagian etanol 96% dan 3 bagian air suling ditambah dengan 10 ml HCl 2 N. Direfluks selama 30 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 20 ml filtrat ditambahkan 25 ml air suling dan 25 ml timbal(Il) asetat 0,4 M, dikocok, lalu didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari 20 ml campuran 3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol dilakukan berulang sebanyak tiga kali, kumpulan sari air diuapkan pada temperatur tidak lebih dari 50 OC. Sisanya dilarutkan dalam 2 ml metanol. Kemudian diambil 0,1 ml. Larutan percobaan dimasukkan kedalam tabung reaksi diuapkan diatas penangas air, pada sisa ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes pereaksi molish. Kemudian secara perlahan ditambahkan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung, jika terbentuk cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida (Depkes RI, 1979).

* 1. **Penetapan Kadar Flavonoid Total**

### 3.10.1 Pembuatan Larutan Kuersetin

Ditimbang 25 mg kuersetin, dilarutkan dalam labu ukur 25 ml ditambah metanol sampai tanda batas kedalam Larutan Induk Baku (C= 1000 μg/ml) LIB I. Lalu dipipet 5 ml dari LIB I dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml dicukupkan dengan metanol sampai tanda batas (C= 100 μg/ml) LIB II (Yeti, 2021).

### 3.10.2 Pembuatan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Dipipet 0,6 dari larutan induk baku II (LIB II) dimasukan kedalam labu ukur 10 ml (C= 6μg/ml), lalu ditambahkan 0,1 ml alcl310%, 0,1 ml natrium asetat 1 M, dan ditambahkan 2,8 ml aquadest, lalu ditambahkan metanol sampai tanda batas, dihomogenkan dan didiemkan selama 30 menit. diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum kuersetin berada pada panjang gelombang 424 nm.

### 3.10.3 Pembuatan *Operating Time*

Dipipet 0,6 ml dari larutan induk baku II (LIB II) dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml (C= 6μg/ml), ditambah 0,1 ml alcl3 10%, 0,1 ml natrium asetat 1 M, dan ditambahkan 2,8 ml aquadest, lalu ditambahkan metanol sampai tanda batas, lalu diukur *operating time* kuersetin selama 60 menit pada panjang gelombang 424 nm (Solika, 2023).

### 3.10.4 Pengukuran Kurva Kalibrasi Kuersetin

Ditimbang 25 mg kuersetin, dimasukkan kedalam labu ukur 25 ml lalu ditambahkan metanol sampai tanda batas (C- 1000 µg/ml) (LIB I). Kemudian dipipet 5 ml dari larutan induk baku I ke dalam labu tukur 50 ml sudah dicukupkan dengan metanol sampai tanda batas (C-100 g/ml) (LIB II). Kemudian dibuat seri kadar lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml masing-masing dipipet 0,2 ml, 0,4 ml. 0,6 ml. 0,8 ml, 10 ml dari LIB II dengan konsentrasi 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml, dan 10 µg/ml. Kemudian dipipet masing-masing dalam labu ukur 10 ml dengan berbagai konsentrasi tersebut kemudian ditambahkan 1,5 ml metanol, 0,1 ml aluminium klorida 10%, 0,1 ml natrium asetat 1 M, dan ditambahkan 2,8 ml aquadest, ditambahkan metanol sampai tanda batas. dihomogenkan dan didiamkan selama 6-9 menit. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 424 nm (Solika, 2023).

### 3.10.5 Penetapan Kadar Flavonoid Total dari Ekstrak Etanol Dan Ekstrak Etil Asetat Sambung nyawa *(Gynura procumbens (*Lour.) Merr)

Ekstrak etanol dan ekstrak etil asetatdaun sambung nyawa *(Gynura procumbens* (Lour.)Merr)ditimbang sebanyak 25 mg dimasukkan kedalam labu ukur 25 ml ditambah metanol sampai tanda batas (C= 1000 μg/ml), lalu dipipet 1ml dari ektrak etanol dan 6 ml dari ekstrak etil asetat dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml kemudian ditambahkan dengan 1,5 ml metanol, 0,1 ml aluminium klorida 10%, 0,1 ml natrium asetat 1 M, ditambahkan 2,8 ml aquadest, lalu dicukupkan dengan metanol sampai tanda batas, dihomogenkan dan didiamkan selama 6-9 menit. Diukur serapannnya pada panjang gelombang maksimum 424 nm.Sampel dibuat dalam enam replikasi untuk setiap analisis dan diperoleh nilai rata-rata absorbansi (Yeti, 2021).

* 1. **Perhitungan Kadar Flavonoid**

Kadar total flavonoid ekstrak etanol dan ekstrak etil asetatdaun Sambung nyawa *(Gynura procumbens* (Lour.) Merr) dapat dihitung dengan mendistribusikan nilai absorbansi sampel kedalam persamaan garis regresi linear yang didapat pada kurva kalibrasi untuk mendapatkan konsentrasinya.Nilai absorbansi sampel yang didapat kemudian didistribusikan lagi kedalam rumus perhitungan sebagai berikut (Yeti, 2021).

Kadar (μg/g) =

Keterangan :

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

V = Volume larutan sampel (ml)

Fp = Faktor pengenceran

W = Berat sampel (g)