# BAB III METODE PENELITIAN

## 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium. Rancangan Penelitian ini meliputi pengumpulan dan pengolahan sampel, karakterisasi simplisia, pembuatan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata* L.), skrining fitokimia, dan penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol dan fraksi etil asetat, fraksi Etil Asetat daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

### **3.1.1 Variabel Penelitian**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dan fraksi etil asetat, daun sirsak (*Annona muricata* L.) sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata* L.).

### **3.1.2 Parameter Penelitian**

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

## 3.2 Jadwal dan lokasi penelitian

### **3.2.1 Jadwal Penelitian**

Waktu penelitian dilakukan pada bulan April 2024

### **3.2.2 Lokasi Penelitian**

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

## 3.3 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi : Daun sirsak, etanol 70%, etil asetat, metanol, asam asetat anhidrida, asam nitrat, asam sulfat, amil alkohol, besi (III) klorida, bismut (III) nitrat, iodium, kalium iodida, serbuk magnesium, raksa (II) klorida, alfa-naftol, timbal (II) asetat, toluena, kloroform, aquadest, asam klorida, kuersetin, aluminium klorida, dan natrium asetat.

## 3.4 Alat-alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu blender, botol berwarna gelap, *rotary evaporator*, alas bulat, corong pisah, kapas, tisu, aluminium foil, timbangan analitik, pipet tetes, batang pengaduk, corong, gelas ukur, erlenmeyer, beaker glass, tabung reaksi, labu ukur, cawan penguap, krus porselin, *hot plate*, dan seperangkat alat spektrofotometri UV-Vis.

## 3.5 Penyiapan Sampel

### **3.5.1 Pengambilan Sampel Tumbuhan**

Sampel daun sirsak yang digunakan pada penelitian ini. 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 daun sirsak yang diteliti.

### **3.5.3 Pengolahan Simplisia**

Sampel daun sirsak (*Annona muricata* L.) 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. Pembuatan serbuk halus bertujuan untuk memaksimalkan proses ekstraksi, semakin kecil ukuran serbuk semakin besar luas permukaannya sehingga interaksi sampel dengan pelarut akan semakin efektif.

## 3.6 Karakterisasi Simplisia

### **3.6.1 Pemeriksaan Makroskopik dan Mikroskopik**

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap tumbuhan segar daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan cara memperhatikan warna, bentuk, bau dan ukuran. Pemeriksaan Mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia daun sirsak (*Annona muricata* L.). Serbuk simplisia ditaburkan di atas kaca objek yang telah ditetesi dengan larutan kloralhidrat dan ditutup dengan deck glass kemudian diamati di bawah mikroskop (Anggraeni,2019).

### **3.6.2 Penetapan Kadar Air**

Penetapan Kadar Air Dilakukan Dengan metode *Azeotropi* (destilasi toluen). Alat terdiri dari alas bulat 500 mL, alat penampung, pendingin,tabung penyambung, dan tabung penerima 10 mL. Langkah pertama dilakukan penjenuhan toluen. Sebanyak 200 mL toluen dan 2 mL air suling 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. Kemudian ke dalam labu tersebut dimasukkan 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama,labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah Toluena 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 terdistilasi, 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 dengan rumus sebagai berikut (Anggraeni, 2019).

%kadar air = x 100%

### **3.6.3 Penetapan kadar sari larut dalam air**

Sebanyak 5 Serbuk Simplisia Dimaserasi selama 24 jam dalam 100 mL air-kloroform (2,5 mL kloroform dalam air suling sampai 1 liter) dalam labu bersumbat sambil dikocok sesekali selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam,lalu disaring.Sejumlah 20 mL filtrat pertama diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang berdasar rata yang telah dipanaskan ditara. Sisa dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam air hitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan dengan rumus sebagai berikut (Anggraeni, 2019).

%kadar sari larut dalam air= 100%

### **3.6.4 Penetapan kadar sari larut dalam etanol**

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol 96% dalam labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol. Sejumlah 20 ml filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang berdasar rata yang telah dipanaskan dan ditara. Sisa dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam etanol dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara dengan rumus sebagai berikut (Anggraeni, 2019).

% Kadar sari larut dalam etanol = 100%

### **3.6.5 Penetapan kadar abu total**

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama dimasukkan kedalam krus porselin yang telah dipijarkan dan ditara kemudian diratakan. Krus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, pemijaran dilakukan pada suhu 600°C selama 3 jam kemudian didinginkan dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara dengan rumus sebagai berikut ( Anggraeni, 2019).

% Kadar abu total = x 100%

### **3.6.6 Penetapan kadar abu tidak larut asam**

Abu yang telah diperoleh pada penetapan kadar abu total, dipanaskan dengan 25 ml asam klorida 2 N selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan , disaring melalui kertas saring bebas abu, kemudian dicuci dengan air panas, residu dengan kertas saring dipijarkan pada suhu 600°C sampai bobot tetap, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan dengan rumus sebagai berikut (Anggraeni, 2019)

% Kadar abu tidak larut dalam asam = x 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 aquadest hingga 100 mL (Sari dan Laoli, 2019).

### **3.7.2 Larutan Pereaksi Mayer**

Sebanyak 1,569 g raksa (II) klorida dilarutkan dalam air suling hingga 100mL. pada wadah lain ditimbang sebanyak 5g kalium iodide lalu dilarutkan dalam 10 mL air suling. Kedua Larutan dicampurkan dan tambahkan air suling hingga diperoleh larutan 100 mL (Sari dan Laoli, 2019).

### **3.7.3 Larutan Pereaksi Dragendorff**

Sebanyak 0,8 g bismut (III) nitrat dilarutkan dalam asam nitrat pekat 20 mL kemudian dicampurkan dengan kalium iodida sebanyak 27,2 g dalam 50 mL air suling. Campuran didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan diencerkan dengan air secukupnya hingga 100 mL (Sari dan Laoli, 2019).

### **3.7.4 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2 N**

Sebanyak 17 mL asam klorida pekat diencerkan dalam aquades hingga 100 mL (Sari dan Laoli, 2019).

### **3.7.5 Larutan Pereaksi Lieberman-Burchard**

Sebanyak 5 bagian volume asam sulfat pekat dicampurkan dengan 50 bagian volume etanol 95%, lalu ditambahkan dengan hati-hati 5 bagian volume asam asetat anhidrida ke dalam campuran tersebut dan didinginkan (Sari dan Laoli, 2019).

### **3.7.6 Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%**

Sebanyak 1 gram besi (III) klorida dilarutkan dengan aquades hingga 100 mL (Sari dan Laoli, 2019).

### **3.7.7 Larutan Pereaksi Molisch**

Sebanyak 3 g alfa-naftol dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N sampai garis tanda (Sari dan Laoli, 2019).

### **3.7.8 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 (Sari dan Laoli, 2019).

## 3.8 Pembuatan Ekstrak Etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.)

Pembuatan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam bejana, dituangi dengan pelarut etanol 70 % sebanyak 3750 mL, didiamkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk, lalu diperas sehingga diperoleh maserat I. Kemudian ampas yang diperoleh dibilas dengan etanol 70 % sebanyak 1250 mL, pindahkan ke dalam 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).

%Rendemen = 100%

## 3.9 Pembuatan Fraksi

Ekstraksi cair-cair dilakukan berturut-turut dengan pelarut n-heksana dan etil asetat. Sebanyak 40 gram ekstrak etanol dilarutkan dalam 100 mL etanol 70% dan ditambahkan 100 mL aquadest lalu dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian ditambah larutan n-heksana 200 mL, digojok dan didiamkan hingga terpisah sempurna. Fase n-heksana akan berada pada bagian atas dan fase etanol-air berada pada bagian bawah, kemudian dipisahkan. Fase etanol-airnya diekstraksi lagi dengan n-heksana sebanyak 8 kali. Fase etanol-air kemudian ditambahkan dengan etil asetat 200 mL, digojok dan didiamkan hingga terpisah sempurna. Fase etil asetat akan berada pada bagian atas dan fase etanol-air berada pada bagian bawah, kemudian dipisahkan. Fase etanol-airnya diekstraksi lagi dengan etil asetat sebanyak 8 kali. Kemudian larutan n-heksana dan larutan etil asetat yang dihasilkan masing-masing dipekatkan hingga didapatkan fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat (Sarker et al., 2006).

## 3.10 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia daun sirsak (*Annona muricata* L.), meliputi pemeriksaan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid/triterpenoid dan glikosida. Skrining fitokimia dilakukan terhadap ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata* L.).

### **3.10.1 Pemeriksaan Alkaloid**

Ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) fraksi etil asetat, ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian ditambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut :

1. Filtrat sebanyak 0,5 mL ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning.
2. Filtrat sebanyak 0,5 mL ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.
3. Filtrat sebanyak 0,5 mL ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Dragendroff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga. Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau kekeruhan sedikitnya 2 reaksi dari 3 percobaan di atas (Mayasari dan Laoli, 2018).

### **3.10.2 Pemeriksaan Flavonoid**

Ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.), fraksi etil asetat, ditimbang sebanyak 10 g kemudian ditambahkan 10 mL air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 mL lalu ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida pekat dan 2 mL amil alkohol, dikocok, dan dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Mayasari dan Laoli, 2018).

### **3.10.3 Pemeriksaan Tanin**

Ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.), fraksi etil asetat, fraksi masing-masing ditimbang 1 g kemudian dididihkan selama 3 menit dalam 100 mL 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 tanin (Mayasari dan Laoli, 2018).

### **3.10.4 Pemeriksaan Saponin**

Ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.), fraksi etil asetat, ditimbang sebanyak 0,5 g sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, timbul busa yang menetap tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Ditambahkan 1 tetes larutan asam klorida 2 N, bila buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Mayasari dan Laoli, 2018).

### **3.10.5 Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid**

Ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.), fraksi etil asetat, ditimbang sebanyak 1 g sampel dimaserasi selama 2 jam dengan 20 mL, lalu disaring.Filtrat diuapkan dalam cawan penguap. Pada Sisa ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchard. Timbulnya warna biru atau biru hijau menunjukkan adanya steroid, sedangkan warna merah, merah muda atau ungu menunjukkan adanya triterpenoida (Mayasari dan Laoli, 2018).

### **3.10.6 Pemeriksaan Glikosida**

Ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.), fraksi etil asetat, ditimbang sebanyak 3 g,lalu disari dengan 30 mL campuran etanol 96% dengan air (7:3) dan 10 mL asam klorida 2N, direfluks selama 2 jam, didinginkan dan disaring. Diambil 20 mL filtrat ditambahkan 25 mL air suling dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok, didiamkan 5 menit lalu disaring. Filtrat disaring dengan 20 mL campuran isopropanol dan kloroform (2:3), dilakukan berulang sebanyak 3 kali. Sari air dikumpulkan dan diuapkan pada temperatur tidak lebih dari 50°C. Sisanya dilarutkan dalam 2 mL metanol. Larutan sisa digunakan untuk percobaan berikut: 0,1 mL larutan percobaan dimasukkan dalam tabung reaksi dan diuapkan diatas penangas air. Pada sisa ditambahkan 2 mL air dan 5 tetes pereaksi Molisch. Kemudian secara perlahan-lahan ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung, terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas kedua cairan menunjukkan ikatan gula (Anggraeni, 2019).

## 3.11 Penetapan Kadar Flavonoid Total

### **3.11.1 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.

**3.11.2 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin**

Dipipet 0,4 mL dari larutan induk baku II (LIB II) dimasukkan kedalam labu tentukur 10 mL (C= 4 µg/mL), lalu ditambahkan 0,1 mL AlCl3 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, dan ditambahkan 2,8 mL aquadest, lalu ditambahkan metanol sampai garis tanda, dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 400-800 nm. Hasil *running* menunjukkan panjang gelombang maksimum kuersetin berada pada panjang gelombang 436 nm (Aminah *et al*, 2017).

### **3.11.3 Pengukuran Operating *Time***

Dipipet 0,4 mL dari larutan induk baku II (LIB II) dimasukkan kedalam labu tentukur 10 ml (C= 4 µg/mL), ditambah 0,1 mL AlCl3 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, dan ditambahkan 2,8 mL aquades, lalu ditambahkan metanol sampai garis tanda, lalu diukur *operating time* kuersetin selama 60 menit pada panjang gelombang 436 nm.

### **3.11.4 Pembuatan 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 di pipet 5 mL dari larutan induk baku I kedalam labu ukur 50 mL dicukupkan dengan metanol sampai tanda batas (C= 100 µg/mL) (LIB II). Kemudian dibuat seri kadar lalu dimasukkan kedalam labu tentukur 10 mL masing-masing dipipet 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL, 0,6 mL dari LIB II dengan konsentrasi 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL, dan 6 µg/mL lalu ditambahkan metanol sampai garis tanda. Dipipet sebanyak 1 mL dari masing-masing labu ukur dengan berbagai konsentrasi tersebut dan dimasukkan kedalam labu tentukur 10 mL kemudian ditambahkan 1,5 mL metanol, 0,1 mL aluminium klorida 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, dan ditambahkan 2,8 mL aquades, ditambahkan metanol sampai garis tanda, dihomogenkan dan didiamkan selama 6-9 menit. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 436 nm (Aminah *et al*, 2017).

### **3.11.5 Penetapan Kadar Flavonoid Total dari Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)**

Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat, daun sirsak (*Annona muricata* L.) ditimbang sebanyak 25 mg dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL ditambah metanol sampai tanda batas (C= 1000 µg/mL), lalu di pipet 1 mL dimasukkan kedalam labu tentukur 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 aquades, lalu dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda, dihomogenkan dan didiamkan selama 6-9 menit. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 436 nm. Sampel dibuat dalam enam replikasi untuk setiap analisis dan diperoleh nilai rata-rata absorbansi (Aminah *et al*, 2017).

## 3.12 Perhitungan Kadar Flavonoid

Kadar total flavonoid ekstrak etanol dan fraksi etil asetat, daun sirsak (*Annona muricata* L.) dapat dihitung dari nilai absorbansi sampel yang diperoleh dari konsentrasi kuersetin dengan persamaan garis regresi linear :

y = a + bx

Keterangan :

y = Luas Kurva

a = Intercept ( Perpotongan garis)

b = Slope ( Kemiringan)

x = Konsentrasi sampel

Nilai absorbansi sampel yang didapat kemudian didistribusikan lagi kedalam rumus perhitungan sebagai berikut ( Winahyu dkk., 2019).

Kadar (g/g) =

Keterangan :

C = Konsentrasi sampel (mg/mL)

V = Volume larutan sampel (mL)

Fp = Faktor pengenceran

W = Berat sampel (g)