

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian yang bersifat deskriptif eksploratif di laboratorium. Variabel bebas yang terdapat pada penelitian ini ialah serbuk simplisia daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*), ekstrak etanol daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*), fraksi etanol-air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan. Sedangkan variabel terikatnya adalah golongan senyawa kimia serta karakteristik simplisia dan ekstrak.

B. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah daun kembang kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) yang segar, berwarna hijau, dan tidak berlubang.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Kimia, Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang untuk melakukan proses identifikasi tanaman, proses ekstraksi maserasi, proses fraksinasi, serta uji skrining fitokimia. Waktu penelitian ini dilaksanakan mulai April-Mei 2022.

D. Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data tentang analisis senyawa metabolit sekunder ekstrak etanol daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) dengan metode maserasi dan fraksinasi dilakukan dengan cara penelitian deskriptif eksploratif di laboratorium.

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi :

- Neraca analitik
- Ayakan 40 mesh
- Pisau
- Botol maserasi atau bejana

- Erlenmeyer 50 ml, 100 ml, dan 250 ml
- Spatula
- Corong pisah
- Gelas ukur 10 ml, 50 ml, dan 500 ml
- *Beaker glass* 250 ml
- Pipet tetes
- Tabung reaksi
- Plat tetes
- Cawan porselen
- Nampan aluminium
- Corong
- Batang pengaduk
- Statif dan klem
- Blender
- Oven
- *Rotary Evaporator*
- *Waterbath*
- Chamber/ bejana eluen
- Pipa kapiler
- Kaca penutup
- Pinset

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi :

- Daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) segar
- Etanol 96%
- HCl 2N
- Pereaksi Mayer
- Pereaksi Bouchardat
- Pereaksi Dragendrof
- Serbuk Mg
- HCl (P)
- Amil alkohol
- H₂SO₄ (P)
- FeCl₃ 3%
- Asam asetat anhidrat
- Aquadest
- n-Heksan
- Etil asetat
- Kertas saring
- Aluminium foil
- Tisu
- Metanol
- Amoniak pekat

2. Prosedur Kerja Penelitian

- a. Dilakukan identifikasi tanaman dengan cara mencocokkan deskripsi tanaman pada buku Flora (Steenis, 2013:395) dan buku Inventaris Tanaman Obat Indonesia (III) (Hutapea, 1994:297-298) dengan tanaman daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*).

- b. Pembuatan Simplisia (Depkes RI, 1985:4-15) Daun Kembang Bulan
- 1) Daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) segar diambil.
 - 2) Dilakukan sortasi basah dengan memisahkan daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) dari kotoran dan bahan asing lain yang tidak diinginkan.
 - 3) Dicuci bersih daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) dengan air mengalir.
 - 4) Dilakukan perajangan daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) untuk memperkecil ukurannya.
 - 5) Daun kembang bulan diletakkan di atas nampan aluminium, kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 55°C.
 - 6) Dilakukan sortasi kering dengan memilih daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) dari benda asing atau pengotor lain yang tertinggal.
 - 7) Diperhalus daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) dengan blender menjadi serbuk kering.
 - 8) Daun kembang bulan yang sudah halus diayak menggunakan ayakan 40 mesh.
- c. Ekstraksi Daun Kembang Bulan Dengan Cara Maserasi (Marjoni, 2016:41)
- 1) Disiapkan wadah atau bejana untuk maserasi.
 - 2) Ditimbang serbuk kering daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) sebanyak 100 gram pada neraca analitik, dimasukkan ke dalam wadah.
 - 3) Ditambahkan 700 ml etanol 96% sehingga semua daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) terendam larutan tersebut, lalu diaduk hingga homogen menggunakan batang pengaduk.
 - 4) Didiamkan selama 72 jam dan diaduk setiap 24 jam.
 - 5) Disaring dan dipisahkan hasil saringan dan endapan menggunakan kertas saring, corong, dan erlenmeyer.
 - 6) Dilakukan remaserasi dengan 300 ml etanol 96% selama 48 jam dan diaduk setiap 24 jam.
 - 7) Disaring kembali hasil remaserasi dan dicampurkan semua maserat yang diperoleh.
 - 8) Maserat dikumpulkan dan diuapkan menggunakan rotary evaporator.

d. Perhitungan Rendemen

Persentase rendemen dihitung dengan cara menghitung jumlah ekstrak kental yang didapat dibagi dengan serbuk kering kemudian dikalikan 100% (Depkes RI dalam Hikmawanti; Priyanto; Prastiwi, 2008).

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak kental (gram)}}{\text{berat serbuk (gram)}} \times 100\%$$

e. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan menggunakan metode partisi cair-cair.

- a) Sebanyak 2,5 gram ekstrak etanol daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) dilarutkan dengan 25 ml aquadest ditambah etanol 96% 10 ml, lalu dilarutkan di atas *waterbath*.
 - b) Dilakukan fraksinasi yang pertama dengan cara mencampurkan ekstrak kental yang sudah dilarutkan sebelumnya, kemudian ditambahkan kembali etanol 96% sebanyak 25 ml, aquadest 25 ml, dan n-heksan sebanyak 25 ml ke dalam corong pisah.
 - c) Dilakukan penggojokan perlahan selama kurang lebih 5 menit. Selama proses penggojokan, harus sering membuka keran corong pisah.
 - d) Didiamkan beberapa menit campuran etanol-air dan n-heksan hingga kedua pelarut memisah.
 - e) Dilakukan pemisahan hingga cairan bening terpisah dari larutan pekat, dengan cara membuka keran corong pisah dan menampungnya dalam *beaker glass*. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.
 - f) Dilakukan fraksinasi yang kedua dengan cara mencampurkan sisa ekstrak etanol 96%, aquadest 25 ml dan etil asetat sebanyak 25 ml ke dalam corong pisah.
 - g) Dilakukan penggojokan perlahan selama kurang lebih 5 menit. Kemudian didiamkan campuran hingga memisah.
 - h) Dilakukan pemisahan dan ditampung pada *beaker glass*. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.
 - i) Dilakukan penguapan fraksi n-heksan dan etil asetat menggunakan *water bath* hingga diperoleh fraksi kental.
- f. Perhitungan Rendemen

Setelah diperoleh fraksi kental menggunakan *rotary evaporator*, dilakukan perhitungan rendemen dari fraksi kental yang dihasilkan (Depkes RI dalam Hikmawanti; Priyanto; Prastiwi, 2008) :

$$\text{Rendemen fraksi (\%)} = \frac{\text{berat fraksi kental (gram)}}{\text{berat fraksi kental yang difraksi (gram)}} \times 100\%$$

g. Skrining Fitokimia

1) Uji Alkaloid

Sampel ditimbang seberat 0,5 gram, ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, lalu dipanaskan di atas tangas air selama 2 menit, dinginkan lalu saring. Filtrat digunakan untuk percobaan berikut :

- a) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer akan menghasilkan endapan putih / kuning.
- b) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat akan menghasilkan endapan coklat hitam.
- c) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendrof akan menghasilkan endapan merah bata.

Uji alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau paling sedikit dua atau tiga dari percobaan di atas, dengan hasil ukur :

(+)	Endapan intensitas lemah
(++)	Endapan intensitas kuat
(+++)	Endapan intensitas sangat kuat

2) Uji Flavonoida

- a) Sebanyak 1 gram sampel ditambahkan dengan 10 ml air panas.
- b) Campuran kemudian dididihkan kurang lebih 5 menit, kemudian disaring ketika panas.
- c) Sebanyak 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg, 1 ml HCl pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok, dan biarkan memisah.

Uji flavonoid dianggap positif jika terjadi warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol, dengan hasil ukur :

(+)	Warna intensitas lemah
(++)	Warna intensitas kuat
(+++)	Warna intensitas sangat kuat

3) Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada uji flavonoida, dilakukan uji penegasan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dengan prosedur kerja :

- a) Pembuatan eluen menggunakan campuran metanol-air (4:1) sebanyak 100 mL.
- b) Disiapkan kertas saring dengan ukuran yang sesuai dengan chamber untuk menutupi bagian dalam chamber.
- c) Eluen dituangkan ke dalam bejana dengan volume tertentu yang menghasilkan ketinggian dalam bejana tidak lebih dari 0,5 cm.
- d) Dilakukan persiapan plat KLT dengan menggunting plat berukuran 10 x 7 cm.
- e) Pada plat KLT, diberi garis totalan, jarak antar sampel, dan jarak elusi (1,5 cm dan 0,5 cm dari ujung plat KLT) menggunakan pensil namun tidak terlalu kuat.
- f) Dilakukan aktivasi lempeng pada oven dengan suhu 100°C selama 25 menit.
- g) Ekstrak kental hasil maserasi dan fraksinasi dilarutkan dengan pelarut yang sesuai.
- h) Dilakukan penotolan sampel menggunakan pipa kapiler, keringkan dengan *hair dryer* agar totalan tidak melebar.
- i) Dimasukkan plat KLT yang telah ditotolkan ke dalam bejana kromatografi dengan bagian aluminium menempel dinding bejana dan bagian bawah menyentuh dasar bejana.
- j) Dibiarkan fase gerak naik hingga jarak elusi 8 cm.
- k) Diangkat plat KLT lalu dibiarkan mengering.
- l) Diuapkan dengan amoniak pada plat KLT, kemudian diamati hasilnya dan diberi tanda pada noda dengan pensil.

Uji flavonoid dengan KLT dianggap positif jika terbentuk bercak kuning, dengan hasil ukur :

(+)	Bercak intensitas lemah
(++)	Bercak intensitas kuat
(+++)	Bercak intensitas sangat kuat

4) Uji Saponin

- Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air suling panas.
- Didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, terbentuk buih atau busa yang selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm.

Uji saponin dianggap positif jika buih tidak hilang pada penambahan 1 tetes larutan HCl 2 N, dengan hasil ukur :

(+)	Buih tidak hilang, setinggi kurang dari 1 cm (0,5 cm)
(++)	Buih tidak hilang, setinggi 1 cm
(+++)	Buih tidak hilang, setinggi lebih dari 1 cm sampai 10 cm

5) Uji Tanin

- Sebanyak 0,5 gram sampel diekstrak menggunakan 10 ml aquadest.
- Hasil ekstraksi disaring kemudian filtrat diencerkan dengan aquadest hingga tidak berwarna.
- Hasil pengenceran diambil sebanyak 2 ml lalu tambahkan 1-2 tetes besi (III) klorida (FeCl_3).

Uji tanin dianggap positif jika terjadi warna biru atau hijau kehitaman, dengan hasil ukur :

(+)	Warna intensitas lemah
(++)	Warna intensitas kuat
(+++)	Warna intensitas sangat kuat

6) Uji Steroid dan Triterpenoid

- Sebanyak 1 gram sampel dimaserasi dengan 20 ml n-heksan selama 2 jam, lalu disaring.
- Filtrat diuapkan dalam cawan penguap.
- Pada sisa ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat.

Uji terpenoid dianggap positif jika terjadi warna ungu atau merah dan pada uji steroid dianggap positif jika terjadi warna hijau biru, dengan hasil ukur :

(+)	Warna intensitas lemah
(++)	Warna intensitas kuat
(+++)	Warna intensitas sangat kuat

E. Pengolahan Data

Data yang didapatkan disajikan dalam bentuk tabel hasil penelitian yang berisi berat rendemen, metabolit sekunder hasil maserasi dan fraksinasi, serta hasil uji skrining fitokimia terhadap ekstrak daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*).

F. Analisis Data

Setelah diperoleh data, dilakukan analisis data dengan menggambarkan metabolit sekunder yang dihasilkan dari ekstraksi secara maserasi dan fraksinasi menggunakan pelarut etanol-air, etil asetat, dan n-heksan.