

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

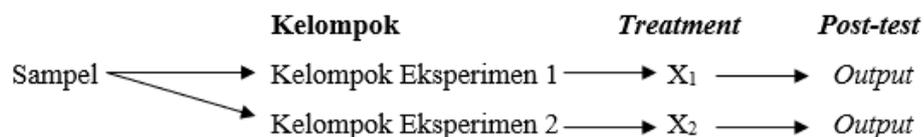
### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

#### 3.1.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium. Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental karena bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut etanol 96% dan metanol pada ekstrak polong cengkeh terhadap penetapan kadar flavonoid total.

#### 3.1.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah *True experimental* dengan bentuk desain *Posttest only control group*. Rancangan *Posttest only control group design* adalah suatu rancangan penelitian yang memberikan perlakuan terhadap kelompok eksperimen dan tidak memberikan perlakuan terhadap kelompok kontrol. Setelah dilakukan perlakuan pada kelompok eksperimen, dilakukan observasi dan membandingkan kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol (Priadana & Sunarsi, 2021).



Gambar 3. 1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

- Kelompok Kontrol : senyawa standar rutin hidrat
- Kelompok Eksperimen 1 : ekstrak etanol 96% polong cengkeh (X<sub>1</sub>)
- Kelompok Eksperimen 2 : ekstrak metanol polong cengkeh (X<sub>2</sub>)
- *Output* : kadar flavonoid total

## **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

### **3.2.1 Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Terpadu dan Laboratorium Farmasetika & Teknologi Sediaan Farmasi Prodi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Panti Waluya Malang.

### **3.2.2 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai dengan bulan Mei 2024.

## **3.3 Populasi dan Sampel**

### **3.3.1 Populasi Penelitian**

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah polong cengkeh yang diperoleh dari salah satu kebun di Desa Pujiharjo, Kabupaten Malang. Polong cengkeh yang digunakan terdapat pada buah cengkeh.

### **3.3.2 Sampel Penelitian**

Penelitian ini menggunakan sampel polong cengkeh segar tua berwarna merah.

## **3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel**

### **3.4.1 Variabel Penelitian**

#### **3.4.1.1 Variabel Terikat**

Variabel terikat (*dependent*) pada penelitian ini adalah kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol 96% dan ekstrak metanol polong cengkeh

#### **3.4.1.2 Variabel Bebas**

Variabel bebas (*independent*) pada penelitian ini adalah pelarut yang digunakan pada ekstraksi polong cengkeh yaitu pelarut etanol 96% dan metanol

#### **3.4.1.3 Variabel Terkontrol**

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah suhu pengeringan pada suhu 50 °C dan jenis ekstraksi yaitu maserasi.

### 3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Data
Polong Cengkeh	Polong cengkeh merupakan hasil dari buah yang telah selesai mekar atau buah yang tua. Pada penelitian ini digunakan polong cengkeh segar yang telah tua, berwarna merah, tidak keriput, tidak berjamur	Organoleptis (warna dan bentuk)	Ordinal
Pelarut Maserasi	Pelarut maserasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Etanol 96% Cairan mudah menguap, jernih, tidak berwarna, bau khas dan menyebabkan rasa terbakar pada lidah.</li> <li>2. Metanol Cairan tidak berwarna, jernih, bau khas.</li> </ol>	Kuantitatif	Ordinal
Kadar Flavonoid Total	Flavonoid terdiri dari beberapa golongan utama antara lain antosianin, flavanol dan flavon, sedangkan khalkon, auron, flavonol, dihidrokhalkon, dan isoflavon penyebarannya hanya terbatas pada jenis tumbuhan tertentu saja. Kadar flavonoid total merupakan pengukuran total kandungan flavonoid pada suatu sampel. Kadar flavonoid total didapatkan dalam	Spektrofotometer <i>UV-Visible</i>	Rasio

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Data
	bentuk persentase dan dikonversikan ke dalam bobot ekivalen senyawa rutin hidrat.		
Senyawa Rutin Hidrat	Rutin merupakan senyawa flavonoid glikosida kuersetin dengan disakarida yang terdiri dari glukosa dan rhamnose. Rutin hidrat mengandung >94% senyawa standar rutin. Kadar senyawa rutin hidrat diukur absorbansinya dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Visible	Spektrofotometer UV-Visible	Rasio

### 3.5 Alat dan Bahan

#### 3.5.1 Alat

Pisau dapur, timbangan analitik, oven, toples kaca, batang pengaduk, kertas saring, erlenmeyer, corong kaca, *rotary evaporator*, cawan penguap, pipet tetes, tabung reaksi, *waterbath*, *beaker glass*, labu ukur, vial, Spektrofotometer UV-Visible

#### 3.5.2 Bahan

Polong cengkeh tua segar, etanol 96%, NaOH, AlCl<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, senyawa rutin hidrat, metanol, CH<sub>3</sub>COOK, aquadest.

### 3.6 Prosedur Kerja

#### 3.6.1 Pengelolaan Sampel

##### a. Penyiapan Sampel

1. Buah cengkeh segar dilakukan sortasi basah dan dipisahkan dari kulitnya sehingga menyisakan biji atau polong cengkeh.

2. Polong cengkeh yang sudah disortasi basah, dicuci dengan air mengalir sampai bersih dan ditiriskan.
3. Tahap selanjutnya adalah dilakukan pengeringan polong cengkeh menggunakan oven pada suhu 50<sup>0</sup>C selama 2x24 jam.
4. Kemudian simplisia polong cengkeh dilakukan sortasi kering dan dihaluskan menggunakan blender.

b. Maserasi

1. Pembuatan ekstrak etanol 96% dan ekstrak metanol polong cengkeh dilakukan dengan cara memasukkan serbuk polong cengkeh ke dalam toples kaca dan ditambahkan masing-masing pelarut etanol 96% dan metanol dengan perbandingan serbuk polong cengkeh dan pelarut adalah 1:6
2. Masing-masing larutan tersebut diaduk dan ditutup rapat, kemudian didiamkan selama 3x24 jam sambil sesekali dilakukan pengadukan, selanjutnya dilakukan penyaringan.
3. Ampas dimaserasi kembali dengan masing-masing pelarut etanol 96% dan metanol dengan volume yang sama pada maserasi pertama lalu didiamkan selama 3x24 jam sambil sesekali diaduk, selanjutnya dilakukan penyaringan sehingga dihasilkan maserat etanol 96% dan maserat metanol polong cengkeh.
4. Hasil maserat etanol 96% dan maserat metanol polong cengkeh dilakukan pengekstrakan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak cair etanol 96% dan ekstrak cair metanol polong cengkeh, kemudian ekstrak tersebut dikentalkan menggunakan *waterbath*.

### 3.6.2 Uji Kualitatif Flavonoid Total

- a. Ekstrak etanol 96% dan ekstrak metanol polong cengkeh dimasukkan pada tabung reaksi kemudian identifikasi dengan pereaksi dan tanpa pereaksi.

- b. Blanko: ekstrak etanol 96% dan ekstrak metanol polong cengkeh dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian diberi aquadest dengan perbandingan yang sama.
- c. Diberikan pereaksi: ekstrak etanol 96% dan ekstrak metanol polong cengkeh dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi identifikasi NaOH, AlCl<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub> dengan perbandingan yang sama.
- d. Amati perubahan warna yang terjadi pada ekstrak etanol 96% dan ekstrak metanol polong cengkeh sebelum dan sesudah diberikan pereaksi
- e. Apabila terjadi perubahan warna menjadi kuning setelah diberikan pereaksi AlCl<sub>3</sub>, terjadi perubahan warna menjadi kuning-cokelat setelah diberikan NaOH dan terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman setelah diberikan pereaksi FeCl<sub>3</sub> maka menunjukkan adanya kandungan flavonoid

### **3.6.3 Pembuatan Larutan Standar Rutin Hidrat**

- a. Pembuatan larutan induk standar rutin hidrat 1000 ppm dibuat dengan memasukkan 25 mg standar rutin hidrat ke dalam labu ukur 25 ml dan ditambahkan aquadest.
- b. Larutan induk standar rutin hidrat diencerkan menjadi beberapa konsentrasi yaitu 100 ppm, 120 ppm, 140 ppm, 180 ppm, dan 200 ppm.
- c. Masing-masing konsentrasi dipipet 0,5 ml dimasukkan ke dalam kuvet, ditambahkan dengan 3 ml metanol, 0,2 ml AlCl<sub>3</sub> 10%, 0,2 ml CH<sub>3</sub>COOK 1M dan ditambahkan aquadest sampai volume akhir 5 ml
- d. Larutan standar rutin hidrat diinkubasi selama 30 menit.
- e. Dilakukan optimasi panjang gelombang maksimum dari larutan standar rutin dengan rentang panjang gelombang 200-500 nm.
- f. Pembacaan nilai absorbansi larutan standar rutin hidrat menggunakan Spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 415 nm (Jaradat dkk., 2015).

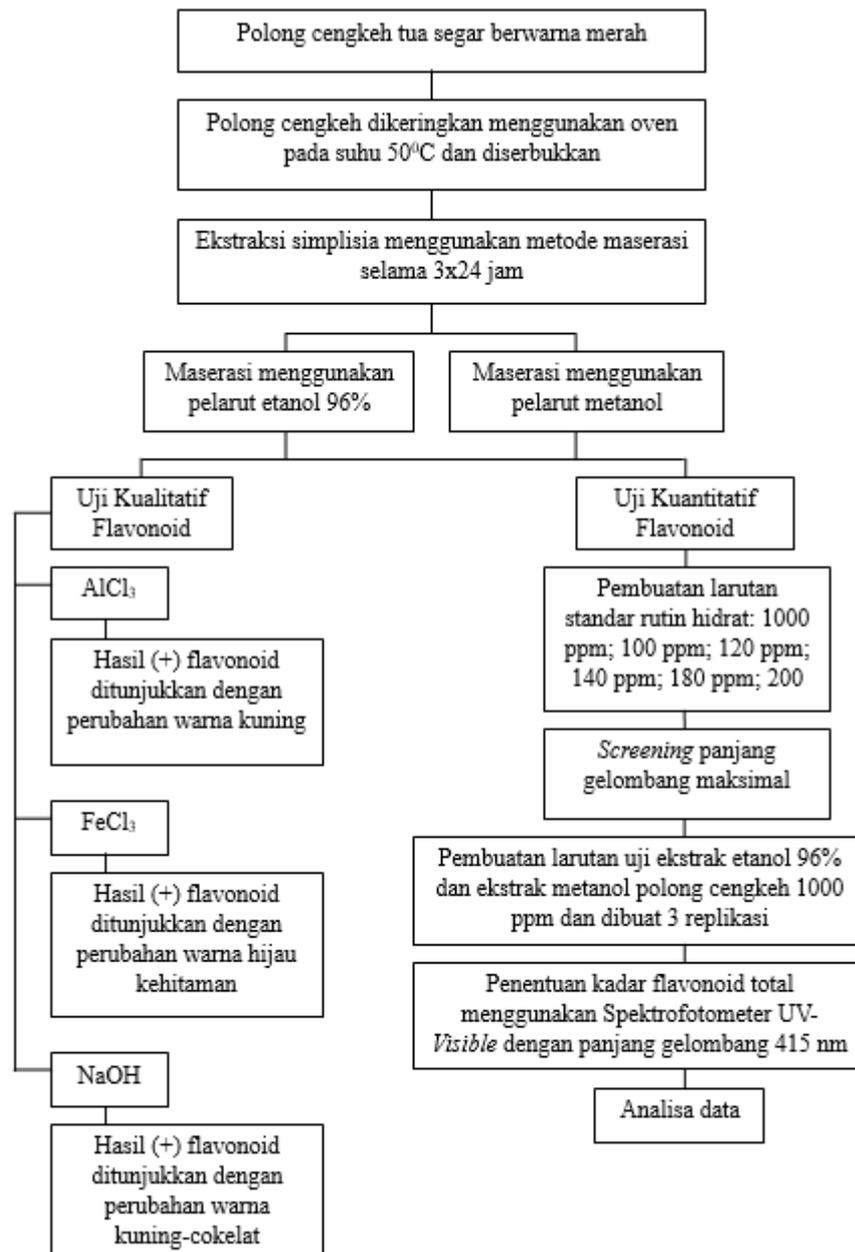
### 3.6.4 Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol dan Ekstrak Metanol Polong Cengkeh

- a. Pembuatan 1000 ppm masing-masing larutan uji ekstrak etanol 96% dan larutan uji ekstrak metanol polong cengkeh dengan menimbang masing-masing 25 mg ekstrak etanol 96% dan ekstrak metanol polong cengkeh lalu dilarutkan dengan 25 ml aquadest.
- b. Dibuat 3 replikasi dengan dipipet masing-masing 0,5 ml larutan uji ekstrak etanol 96% dan larutan uji ekstrak metanol polong cengkeh dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian ditambahkan dengan 3 ml metanol, 0,2 ml  $\text{AlCl}_3$  10%, 0,2 ml  $\text{CH}_3\text{COOK}$  1M dan di tambahkan aquadest sampai volume akhir 5 ml
- c. Larutan uji ekstrak etanol 96% dan ekstrak metanol polong cengkeh diinkubasi selama 30 menit.
- d. Pembacaan nilai absorbansi larutan uji ekstrak etanol 96% dan ekstrak metanol polong cengkeh pada panjang gelombang 415 nm dengan menggunakan Spektrofotometri *UV-Visible*

### 3.6.5 Analisis Data

Nilai absorbansi larutan standar rutin hidrat yang diperoleh pada penelitian ini dianalisa menggunakan aplikasi *IBM SPSS Statistics 26* dengan metode kurva standar regresi linier  $y = bx + a$  dibuat berdasarkan data luas area di bawah kurva data konsentrasi dari larutan standar. Lalu nilai absorbansi ekstrak etanol 96% dan ekstrak metanol polong cengkeh dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier sehingga didapatkan kadar flavonoid total ekstrak etanol 96% dan ekstrak metanol polong cengkeh. Pengaruh perbedaan pelarut terhadap kadar flavonoid total dihitung dengan menggunakan *Independent T-test* jika memenuhi persyaratan data terdistribusi normal dan homogen, namun jika data tidak terdistribusi normal dapat menggunakan *Mann-Whitney Test*.

### 3.7 Kerangka Kerja



Gambar 3.2 Diagram Kerangka Kerja