

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Objek Penelitian

Pada penelitian ini, objek yang akan diteliti adalah tanaman rumput jari (*Digitaria sanguinalis*). Dalam hal ini peneliti akan membuat ekstrak etanol dari seluruh tanaman rumput jari meliputi akar, batang, daun, dan bunga. Setelah mendapatkan ekstrak kemudian diuji untuk mengetahui kandungan kadar flavonoid serta menganalisis aktivitas antioksidannya dengan metode Spektrofotometri UV-Vis.

3.2. Sampel dan Teknik Sampling

Sampel adalah sebagian yang diambil dari populasi, sehingga sampel dalam penelitian ini adalah tanaman rumput jari yang meliputi bagian akar, batang, daun, dan bunga (*Digitaria sanguinalis*) yang diperoleh dari sawah desa Margadana Kota Tegal, Jawa Tengah. Sedangkan bahan-bahan lainnya diperoleh di Laboratorium Universitas Harkat Negeri. Teknik Sampling yang digunakan yaitu *simple random sampling*.

Simple random sampling merupakan teknik acak yang sederhana, karena pengambilan sampel dilakukan secara acak tanpa melihat ukuran sampel yang diteliti. Kemudian sampel di ekstraksi menggunakan metode maserasi.

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah faktor-faktor yang menjadi pokok permasalahan yang ingin diteliti atau penyebab utama suatu gejala. Sesuai dengan tujuan penelitian yang ingin dicapai. Dalam hal ini variabel bebasnya adalah lokasi penemuan tanaman, jenis tanaman, dan ekstrak etanol tanaman rumput jari (*Digitaria sanguinalis*).

3.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat, karena adanya variabel bebas. Variabel dalam penelitian ini variabel terikatnya adalah hasil kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan.

3.3.3. Variabel Terkendali

Variabel terikat adalah variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan sehingga hubungan variabel bebas terhadap terikat tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti. Variabel dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi, jenis pelarut, metode analisis kualitatif dan kuantitatif dan analisis peruraian data.

3.4. Teknik Pengumpulan Sampel

3.4.1. Cara Pengumpulan Data

1. Jenis data yang digunakan bersifat kualitatif dan kuantitatif.

2. Metode pengumpulan data menggunakan eksperimen
Laboratorium DIII Farmasi Universitas Harkat Negeri.

3.4.2. Alat dan Bahan

Alat

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex), kertas saring, cawan porselin, oven microwave (Polytron), magnetic stirrer, ayakan, timbangan analitik (Ohaus), pipet, mikro pipet, yellow tube, blue tube, blender, spatula, sudip, incubator, gelas ukur, erlenmeyer, beaker glass, dan spektrofotometri UV-Vis.

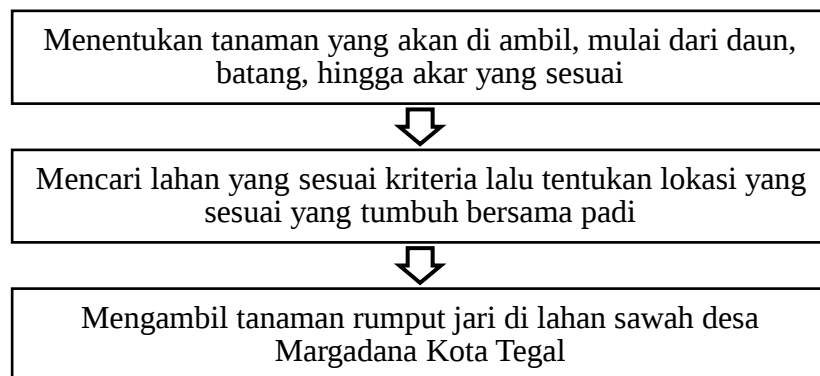
Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanaman rumput jari (*Digitaria sanguinalis*), aquadest, methanol, etanol 96%, FeCl_3 , Dragendroff, HNO_3 , HCl , NaOH , H_2SO_4 , larutan standar kuarsetin.

3.5. Cara Kerja

3.5.1. Pengambilan Sampel

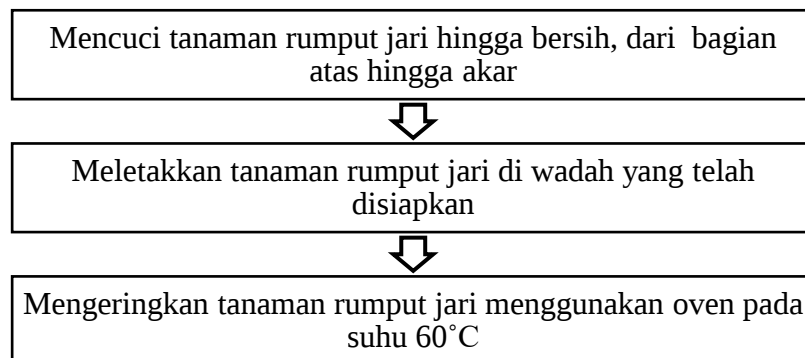
Sampel yang digunakan ialah rumput jari (*Digitaria sanguinalis*) diambil dari lahan padi yang akan panen di sawah desa Margadana Kota Tegal, Jawa Tengah.



Gambar 3.1. Pengambilan Gulma Pada Lahan Sawah

3.5.2. Pengeringan Tanaman

Metode pengeringan yang akan dilakukan yaitu pengeringan dengan menggunakan suhu 60° C. Berat kering tanaman rumput jari didapatkan setelah tanaman rumput jari sudah kering dan susut pengeringannya mencapai 90% lalu dilakukan penimbangan.



Gambar 3.2. Pengeringan Tanaman Rumput Jari

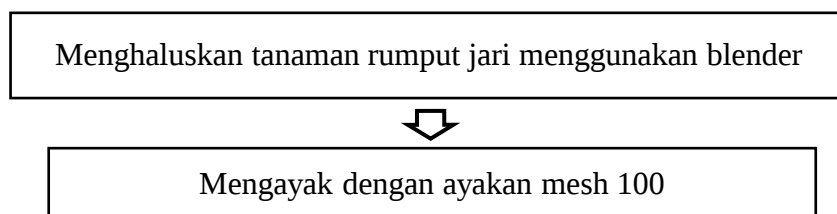
Tanaman rumput jari (*Digitaria sanguinalis*) basah ditimbang sebanyak 74,530 g. Selanjutnya melakukan pengeringan dalam oven pada suhu 60°C menunggu hingga tanaman kering. Setelah itu, tanaman kering ditimbang kembali dan diperoleh hasil seberat 23,737 g. Sehingga memperoleh susut pengeringan sebesar:

Untuk presentase pengeringannya dapat dihitung dengan rumus:

$$\% = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100$$

3.5.3. Pembuatan Serbuk Simplisia

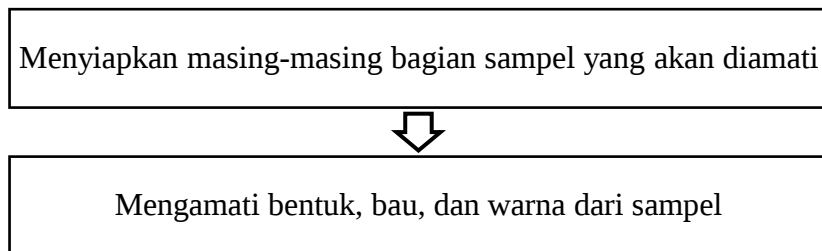
Setelah kering, rumput jari (*Digitaria sanguinalis*) dihaluskan menggunakan blender hingga menghasilkan serbuk simplisia, lalu dia ayak menggunakan ayakan mesh 100.



Gambar 3.3. Pembuatan Serbuk Rumput Jari

3.5.4. Uji Makroskopik Tanaman

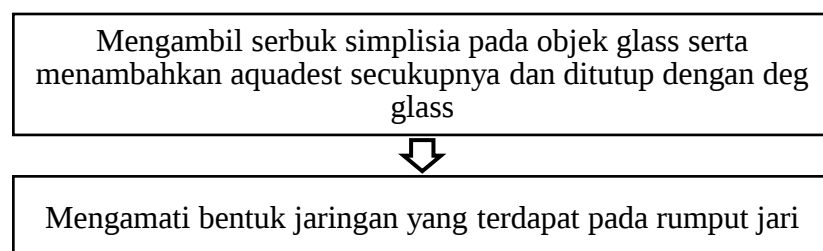
Makroskopik pada sampel yang akan digunakan dengan mengamati bentuk, bau, dan, warna dari masing-masing sampel yang telah dipilih.



Gambar 3.4. Uji Makroskopik Tanaman Rumpu Jari
(*Digitaria sanguinalis*)

3.5.5. Uji Mikroskopik Simplisia

Tanaman rumput jari diidentifikasi dengan menggunakan mikroskop. Serbuk rumput jari diletakkan pada objek glass dengan menambahkan aquadest secukupnya dan ditutup dengan deg glass kemudian mengamati bentuk jaringan penampang yang terdapat di dalam serbuk rumput jari.



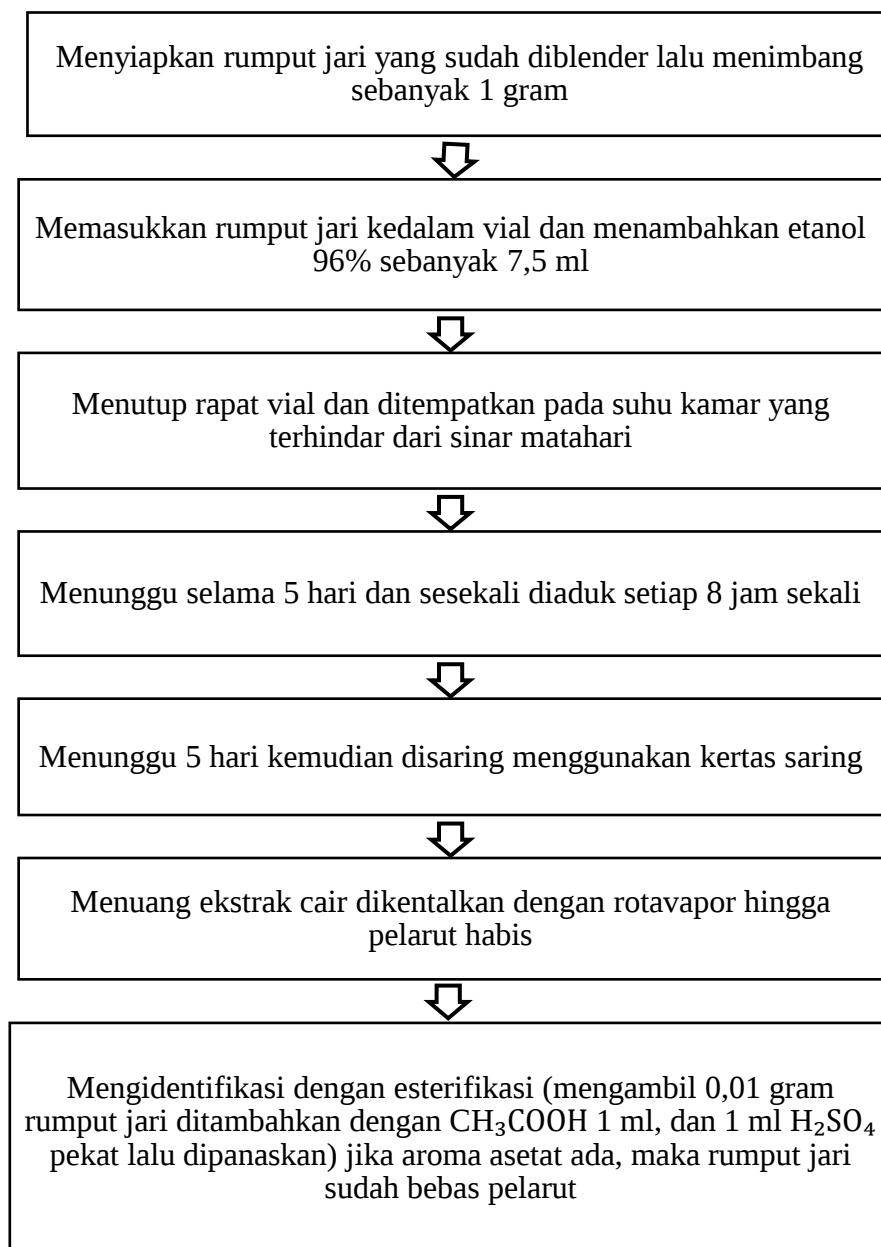
Gambar 3.5. Uji Mikroskopik Simplisia Rumpu Jari (*Digitaria sanguinalis*)

3.5.6. Proses Maserasi

Menyiapkan tanaman rumput jari yang sudah diblender, lalu menimbang sebanyak 1 gram. Memasukkan sampel rumput jari kedalam vial dan menambahkan etanol 96% sebanyak 7,5 ml sampai terendam, dan ditempatkan pada suhu kamar terhindar dari sinar matahari. Diamkan selama 5 hari sambil diaduk 8 jam sekali agar homogen. Kemudian larutan ekstra hasil maserasi disaring dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat yang berhasil ditampung ke dalam beaker glass lalu dipekatkan di atas rotavapor hingga pelarut habis.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat serbuk simplisia}} \times 100\%$$

Proses maserasi dapat dilihat pada skema dibawah ini:

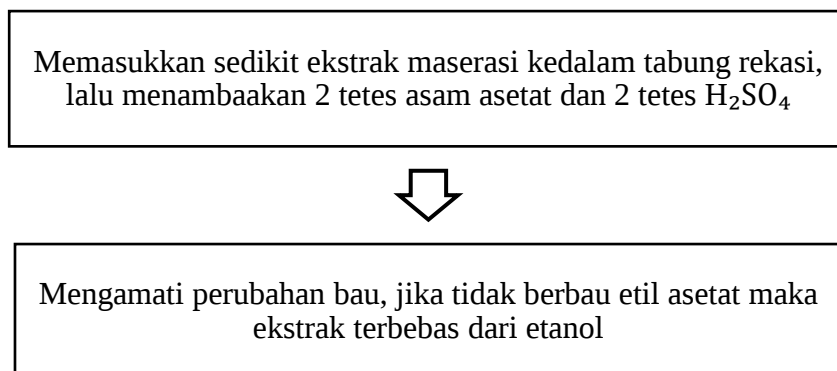


Gambar 3.6. Ekstraksi dengan Metode Maserasi

3.5.7. Uji Bebas Etanol

Memasukkan sedikit ekstrak maserasi tanaman rumput jari ke dalam tabung reaksi, lalu menambahkan 2 tetes H_2SO_4 . Kemudian

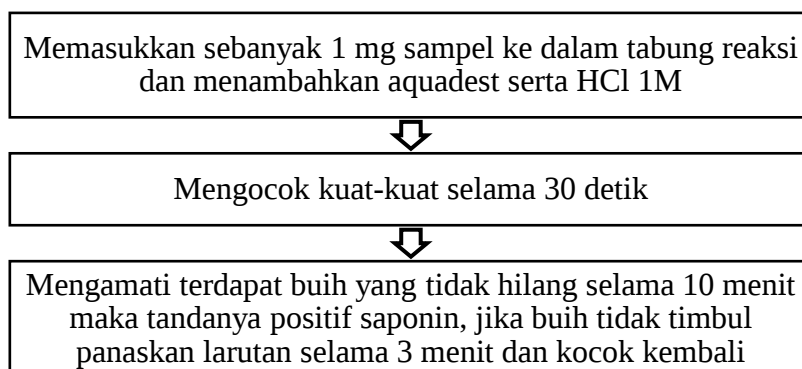
mengamati perubahan bau, jika tidak berbau etil asetat maka ekstrak terbebas dari etanol (Fatyani, 2017).



Gambar 3.7. Uji Bebas Etanol

3.5.8. Pengujian Saponin

Memasukkan sebanyak 1mg sampel kedalam tabung reaksi. Menambahkan aquadest dan HCl 1M kemudian kocok kuat-kuat selama 30 detik. Jika terdapat buih dan stabil selama ± 10 menit maka positif saponin. Jika buih tak timbul panaskan ± 3 menit lalu dinginkan, lalu dikocok kembali.

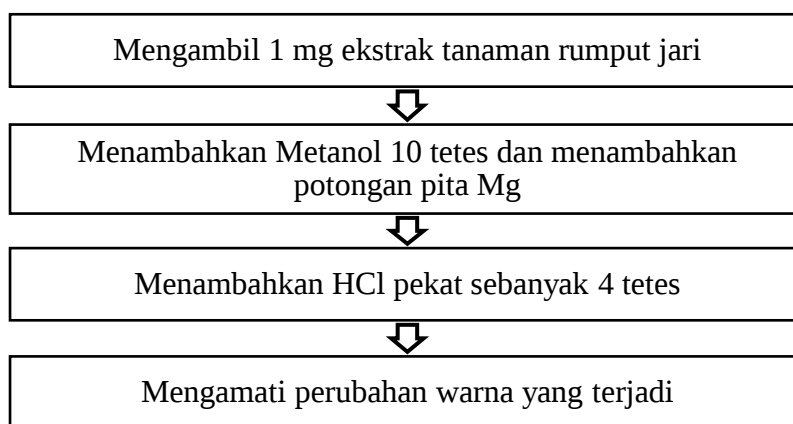


Gambar 3.8. Identifikasi Saponin

3.5.9. Pengujian Flavonoid

Mengambil ekstrak sebanyak 1mg kemudian menambahkan metanol sebanyak 10 tetes, potongan pita Mg ditambah dengan HCl pekat sebanyak 4 tetes. Mengamati perubahan warna yang terjadi.

Proses identifikasi senyawa flavonoid dapat dilihat pada skema dibawah ini

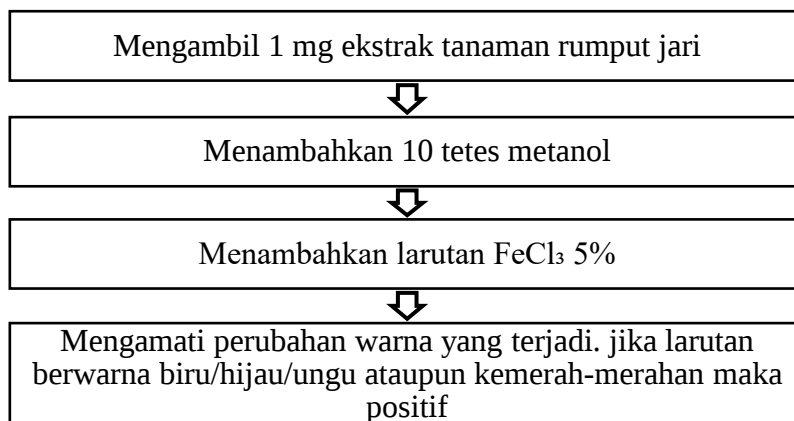


Gambar 3.9. Identifikasi Flavonoid

3.5.10. Pengujian Fenol

Mengambil ekstrak sebanyak 1mg kemudian menambahkan methanol 10 tetes. Selanjutnya menambahkan larutan FeCl_3 lalu mengamati perubahan warna yang terjadi.

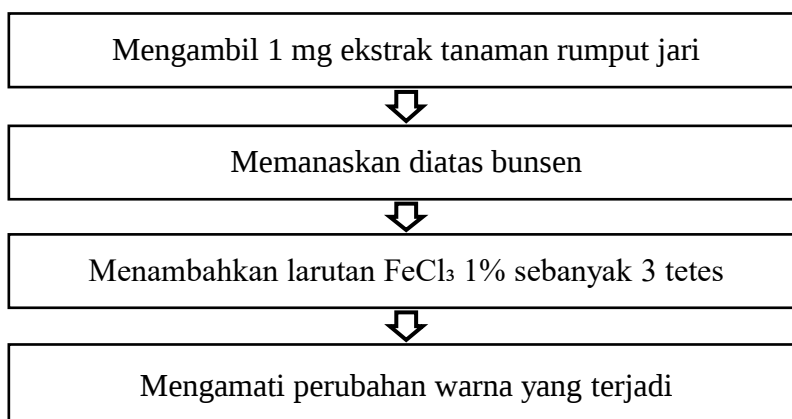
Proses identifikasi senyawa fenol dapat dilihat pada skema dibawah ini



Gambar 3.10. Identifikasi Senyawa Fenol

3.5.11. Pengujian Tanin

Mengambil ekstrak sebanyak 1 ml etanol, kemudian panaskan. Menambahkan larutan FeCl_3 1% sebanyak 3 tetes. Hasil positif ditandai dengan warna biru tua atau hitam kehijauan.



Gambar 3.11. Identifikasi Senyawa Tanin

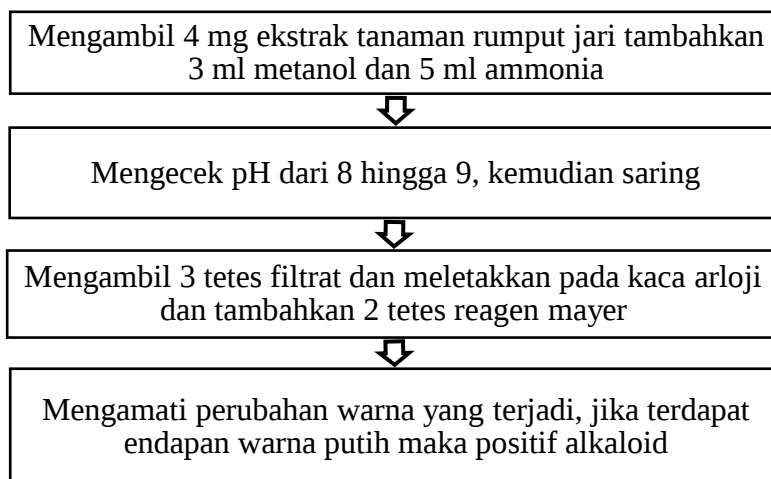
3.5.12. Pengujian Alkaloid

1. Identifikasi Dengan Reagen Mayer

Mengambil 4 mg ekstrak tanaman rumput jari, lalu menambahkan methanol 3 ml dan 5 ml ammonia hingga

mencapai pH 8–9 lalu disaring. Setelah disaring dan menjadi larutan, lalu menambahkan HCl 2M sebanyak 2 ml kemudian dikocok.

Mengambil 3 tetes filtrat, lalu meletakkan pada kaca arloji. Menambahkan 2 tetes reagen mayer. Mengamati perubahan yang terjadi. Hasil positif ditandai dengan adanya endapan berwarna putih.

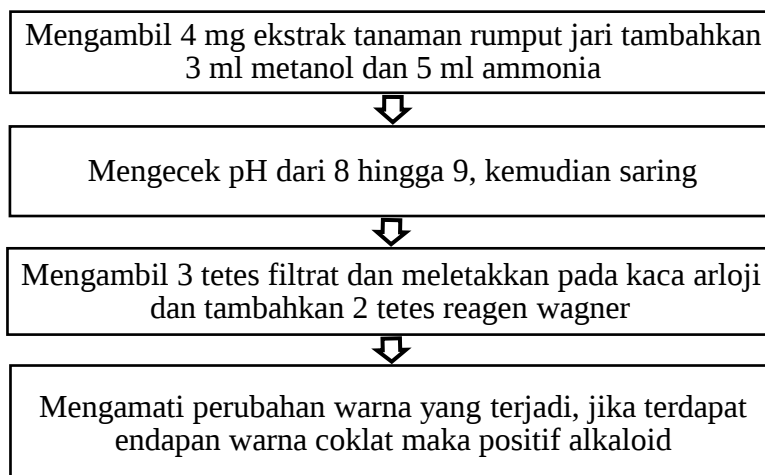


Gambar 3.12. Identifikasi Reagen Mayer

2. Identifikasi Dengan Wagner

Mengambil 4 mg ekstrak tanaman rumput jari, lalu menambahkan methanol 3 ml dan 5 ml ammonia hingga mencapai pH 8–9 lalu disaring. Setelah disaring dan menjadi larutan, lalu menambahkan HCl 2M sebanyak 2 ml kemudian dikocok.

Mengambil 3 tetes filtrat, lalu meletakkan pada kaca arloji. Menambahkan 2 tetes reagen wagner. Mengamati perubahan yang terjadi. Hasil positif ditandai dengan adanya endapan berwarna coklat.



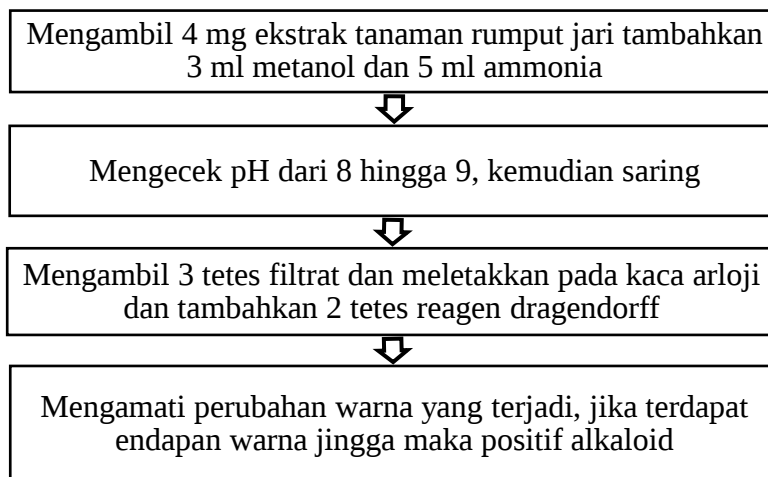
Gambar 3.13. Identifikasi Reagen Wagner

3. Identifikasi Dengan Reagen Dragendorff

Mengambil 4 mg ekstrak tanaman rumput jari, lalu menambahkan methanol 3 ml dan 5 ml ammonia hingga mencapai pH 8–9 lalu disaring. Setelah disaring dan menjadi larutan, lalu menambahkan HCl 2M sebanyak 2 ml kemudian dikocok.

Mengambil 3 tetes filtrat, lalu meletakkan pada kaca arloji. Menambahkan 2 tetes reagen dragendorff. Mengamati

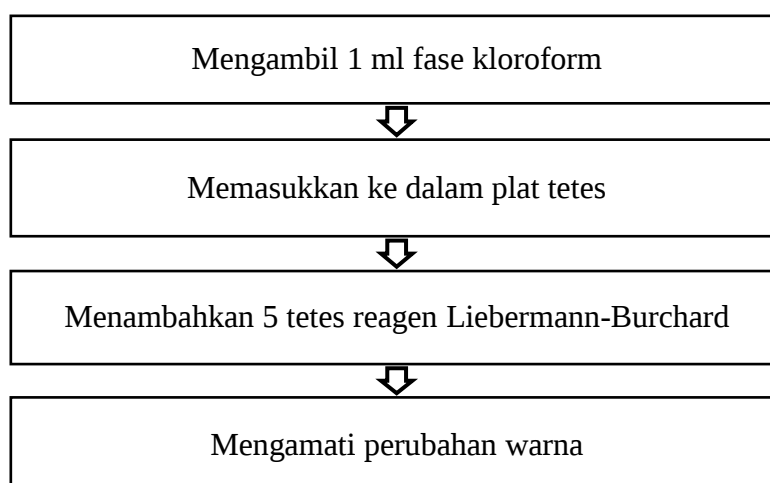
perubahan yang terjadi. Hasil positif ditandai dengan adanya endapan berwarna jingga



Gambar 3.14. Identifikasi Reagen Dragendorff

3.5.13. Pengujian Triterpenoid dan Steroid

Memasukkan 1 ml fase kloroform ke dalam plat tetes, kemudian ditambahkan 5 tetes reagen Liebermann-Burchard ke dalam plat tetes, adanya steroid akan membentuk lapisan cincin warna biru atau hiau, sedangkan terpenoid memberikan warna hijau pekat

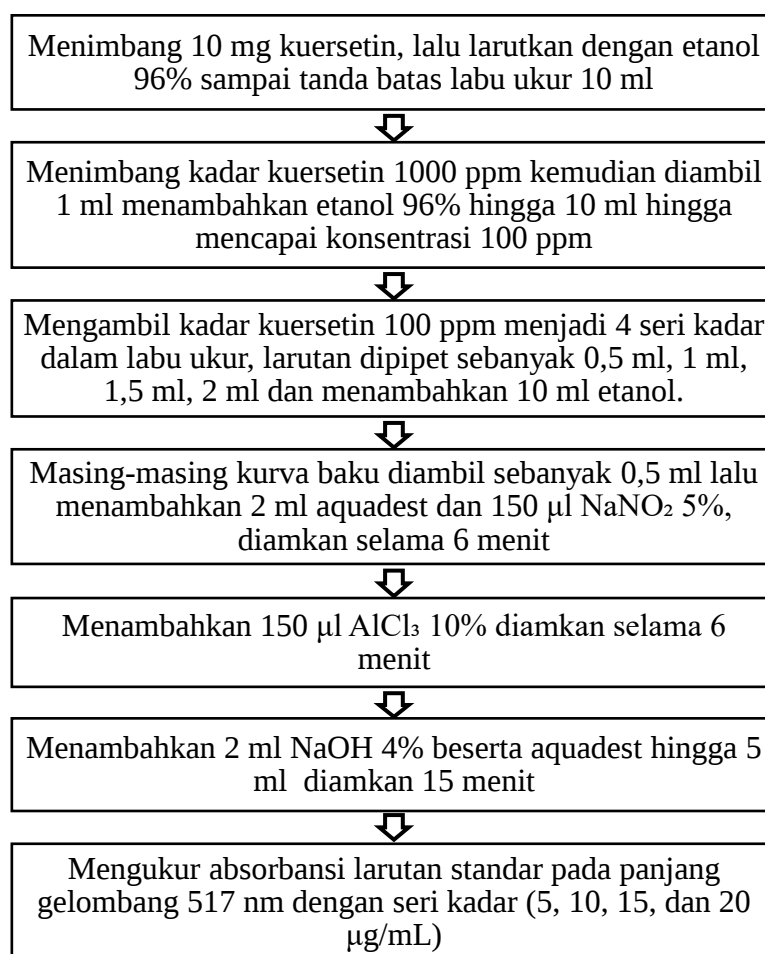


Gambar 3.15. Identifikasi Triterpenoid dan Steroid

3.5.14. Analisis Kuantitatif Senyawa Flavonoid

1. Pembuatan Kurva Standar Kuersetin

Larutan baku kuersetin (1000 ppm) dibuat dengan cara menimbang 10 mg kuersetin larutkan dalam etanol 96% dalam labu ukur 10 ml hingga tanda batas, hingga konsentrasi menjadi 1000 ppm.

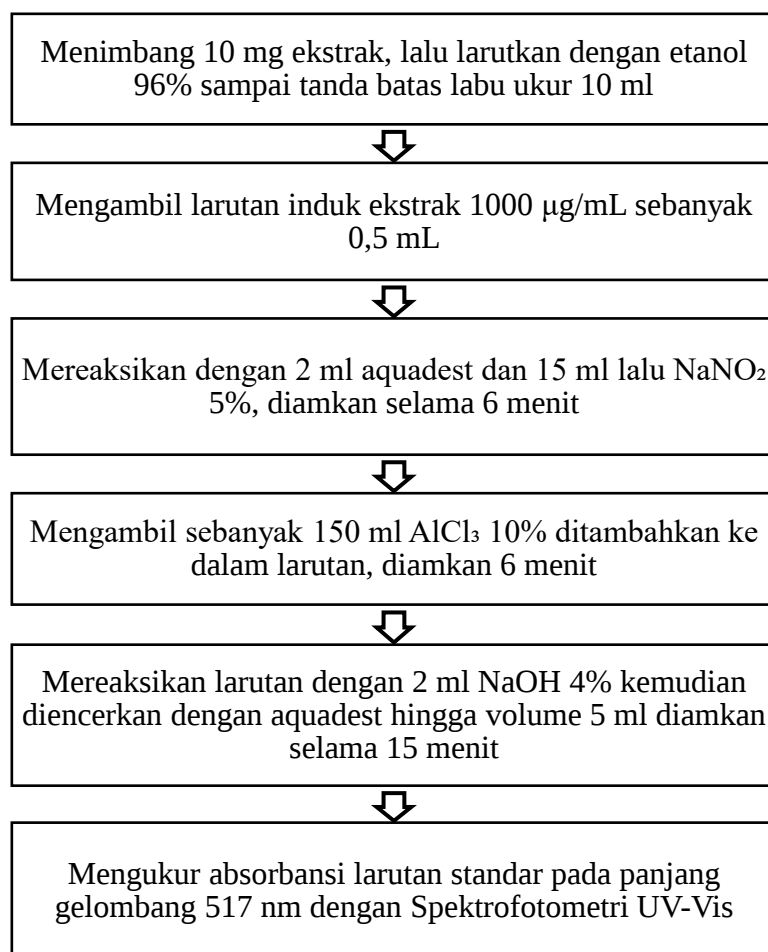


Gambar 3.16. Pembuatan Kurva Standar Kuersetin

2. Pembuatan Absorbansi Ekstrak

Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dalam labu takar 10 ml dengan pelarut etanol 96% hingga tanda (kadar ekstrak menjadi

1mg/mL atau 1000 μ g/mL). Lalu larutan induk 1000 μ g/mL diambil sebanyak 0,5 mL direaksikan dengan 2 ml aquadest dan 15 ml NaNO₂ 5% kemudian didiamkan selama 6 menit. Sebanyak 0,15 ml. AlCl₃ 10% ditambahkan ke dalam larutan, kemudian didiamkan kembali selama 6 menit. Larutan direaksikan dengan 2 mL. NaOH 4%, kemudian diencerkan dengan aquadest hingga volume 5 ml dan didiamkan 15 menit. Mengukur absorbansi larutan pada panjang gelombang 517 nm dengan spektrofotometri UV-Vis.

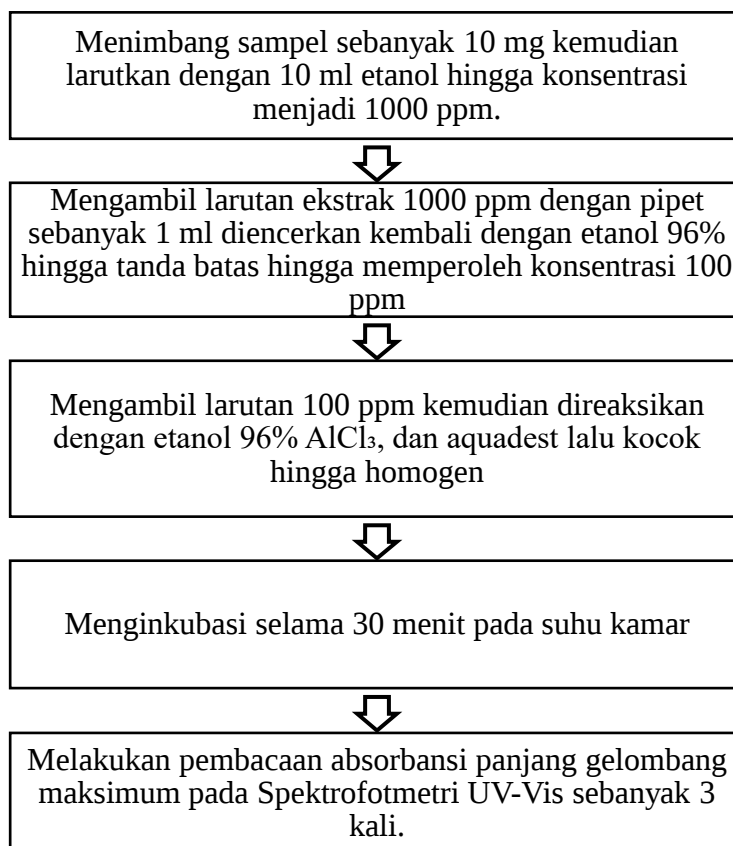


Gambar 3.17. Pembuatan Absorbansi Ekstrak

3. Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Rumput Jari

(Digitaria sanguinalis)

Sampel ekstrak rumput jari sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 10 mL etanol 96% hingga diperoleh larutan 1000 ppm. Larutan tersebut diencerkan menjadi 100 ppm, kemudian direaksikan dengan etanol 96%, AlCl_3 , dan aquadest. Setelah homogen dan diinkubasi 30 menit pada suhu kamar, absorbansinya diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis sebanyak tiga kali pengulangan

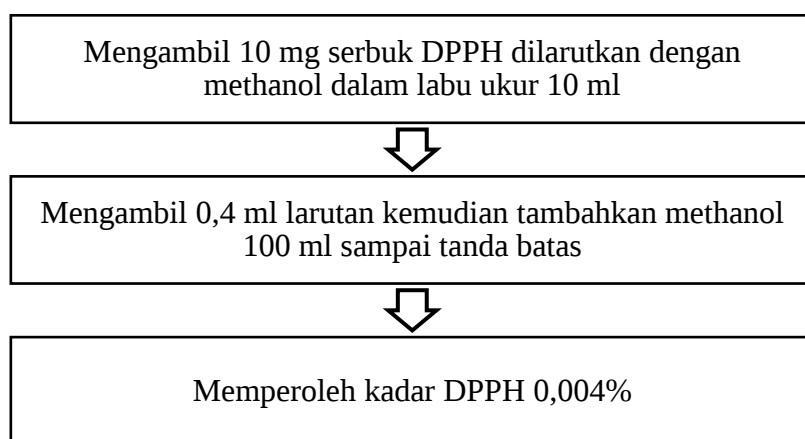


Gambar 3.18. Penentuan Kadar Flavonoid

3.5.15. Penentuan IC_{50}

1. Pembuatan Larutan DPPH

Dibuat larutan DPPH 1000 ppm dengan cara mengambil 10 mg serbuk DPPH dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 10 ml. Setelah itu, larutan DPPH dibuat konsentrasi 40 ppm yaitu mengambil 0,4 ml larutan kemudian tambahkan methanol 100 ml sampai tanda batas dan diperoleh kadar DPPH 0,004%.

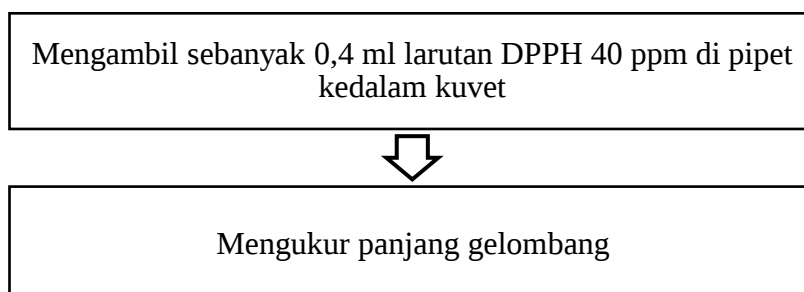


Gambar 3.19. Pembuatan Larutan DPPH

(Nurchahyo 2022)

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Sebanyak 0,4 ml larutan DPPH 40 ppm di pipet ke dalam kuvet dan diukur untuk menentukan panjang gelombangnya.

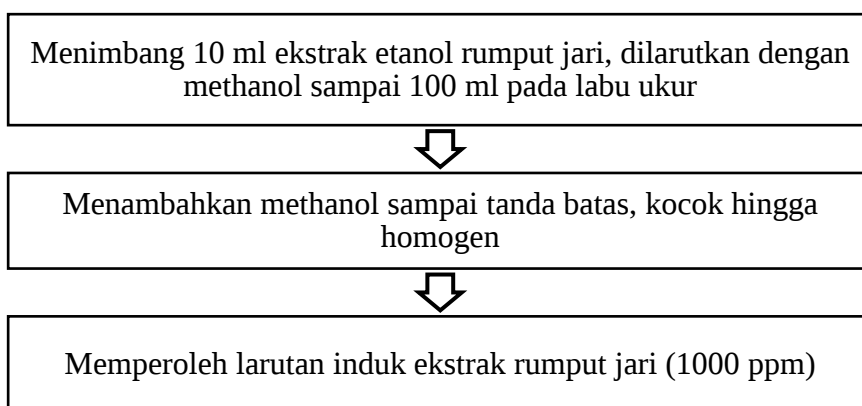


Gambar 3.20. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

(Nurchahyo 2022)

3. Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Rumput Jari (1000 ppm)

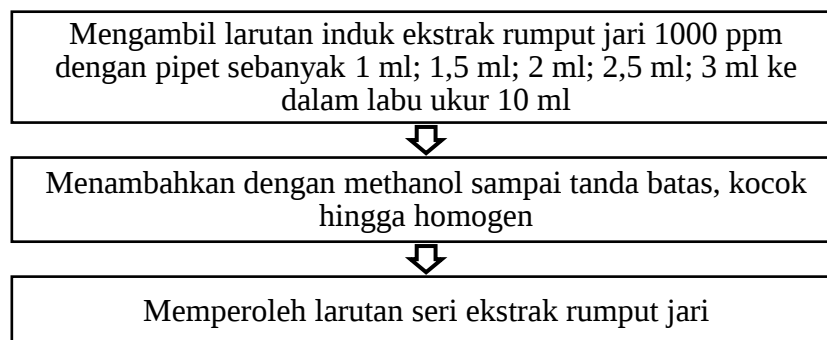
Hasil ekstraksi tanaman rumput jari ditimbang sebanyak 10 ml dilarutkan dengan methanol sampai 100 ml pada labu ukur. Volume dicukupkan dengan methanol sampai tanda batas lalu kocok hingga homogen.



Gambar 3.21. Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Rumput Jari (1000 ppm)

4. Pembuatan Larutan Seri Ekstrak Rumput Jari (100, 150, 200, 250, 300 ppm)

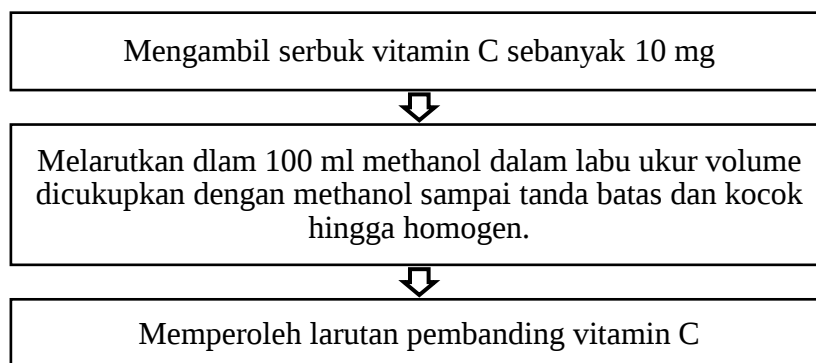
Larutan induk ekstrak tanaman rumput jari 1000 ppm dipipet sebanyak 1 ml, 1,5 ml, 2 ml; 2,5 ml; 3 ml ke dalam labu ukur 10 ml kemudian dicukupkan dengan methanol sampai tanda batas, kocok sampai homogen 27).



Gambar 3.22. Pembuatan Larutan Seri Ekstrak Rumput Jari
(Purdiyanti 2022)

5. Pembuatan Larutan Pembanding Vitamin C (1000 ppm)

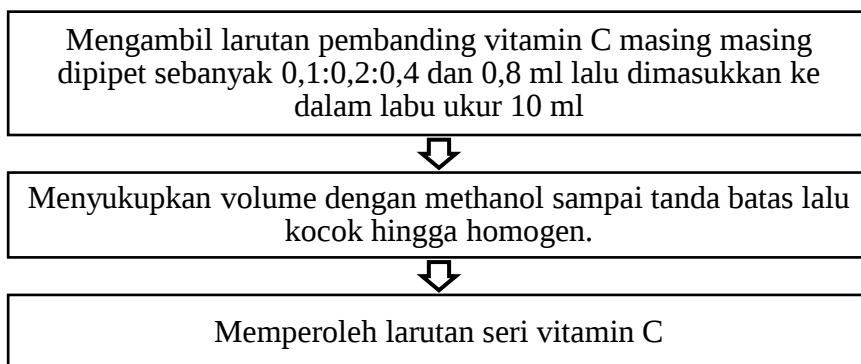
Serbuk vitamin C diambil sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 ml methanol dalam labu ukur volume dicukupkan dengan methanol sampai tanda batas dan kocok hingga homogen.



Gambar 3.23. Pembuatan Larutan Pembanding Vitamin C

6. Pembuatan Larutan Seri Vitamin C (10, 20, 40, 80 ppm)

Larutan pembanding vitamin C masing-masing dipipet sebanyak 0,1: 0,2: 0,4 dan 0,8 ml lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml. Volume dicukupkan dengan methanol sampai tanda batas lalu kocok hingga homogen.



Gambar 3.24. Pembuatan Larutan Seri Vitamin C
(Purgiyanti 2022)

7. Penentuan *operating time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mereaksikan 50 μ l baku pembanding vitamin C ditambah 4,0 ml larutan DPPH, 40 ppm lalu dihomogenkan dengan stirrer selama satu menit dan diukur pada menit ke 0,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35,

40, 45, 50, 55, dan 60 pada gelombang maksimal yang sudah diperoleh.

Mereaksikan 50 μ l baku pembanding vitamin C ditambah 4,0 ml larutan DPPH, 40 ppm lalu dihomogenkan dengan stirrer selama satu menit.

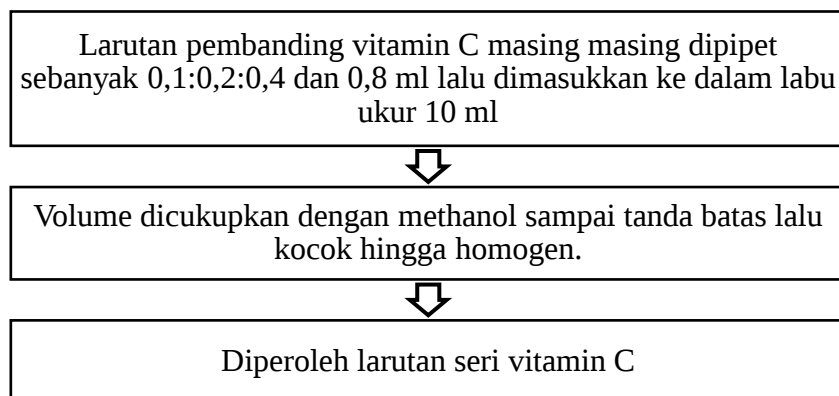


Mengukur pada menit ke 0,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60 pada gelombang maksimal yang sudah diperoleh.

Gambar 3.25. Penentuan *Operating Time*

8. Pengukuran Aktivitas Antoksidan

Sebanyak 3,0 ml DPPH dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 1,5 ml ekstrak etanol rumput jari, kemudian di stirrer satu menit sampai homogen dan didiamkan selama 30 menit di tempat gelap, baca absorbansinya pada λ maksimal (515 nm).



Gambar 3.26. Pengukuran Aktivitas Antioksidan (Nurcahyo 2022)

9. Analisis Data Aktivitas Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH dinyatakan dengan nilai perendaman DPPH (% inhibisi), semakin besar nilai perendamannya maka akan semakin besar juga nilai antioksidannya.

Prosentase aktivitas penghambatan DPPH pada masing-masing sediaan (26). Prosentase aktivitas penghambatan DPPH pada masing-masing ekstrak dapat dinyatakan dalam rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

3.5.16. Metode Analisis Data

Kadar penetapan flavonoid dilakukan melalui perhitungan dengan persamaan regresi linear yang diperoleh dari kurva kalibrasi hasil pengukuran absorbansi larutan standar kuersetin menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dan disajikan dalam bentuk grafik. Dengan menggunakan rumus $y=ax+b$ dimana y adalah absorbansi, b adalah intersep, a adalah slope dan x adalah konsentrasi.