

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimen

B. Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi, Laboratorium Kimia dan Laboratorium Farmasi Bahan Alam.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April- Juni 2026.

C. Populasi dan sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun dan kulit batang kelor (*Moringa oleifera L*) yang berasal dari Kelapa Lima, Kota Kupang.

2. Sampel

Sampel adalah bagian dari populasi yang diharapkan mampu mewakili populasi dalam sampel penelitian. Sampel yang digunakan adalah ekstrak daun dan kulit batang kelor (*Moringa oleifera L*) diperoleh dari Kelapa Lima, Kota Kupang. Proses pengambilan daun dan kulit batang dilakukan pada pagi hari dengan tujuan untuk mendapatkan senyawa aktif yang tinggi, karena jika diambil pada saat siang hari tanaman akan mengalami

fotosintesis sehingga senyawa aktif yang akan ditarik Surang optimal (Sari, 2020).

D. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bagian tanaman kelor yang dibandingkan, yaitu daun kelor dan kulit batang kelor.

2. Variabel terikat

Variable terikat dalam penelitian ini adalah kadar senyawa flavonoid yang diukur pada masing-masing bagian tanaman menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis.

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu dalam penelitian ini adalah lama pengeringan simplisia kulit batang kelor, lama dan kecepatan pengadukan, kondisi bahan dan kualitas

E. Defenisi operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Kelor	Ekstrak kental hasil maserasi daun dan kulit batang kelor dengan menggunakan pelarut etanol 70%	Timbangan Analitik	Bobot Ekstrak	Rasio

Kandungan Flavonoid Total	Jumlah flavonoid total dalam ekstrak daun dan kulit batang kelor dinyatakan dalam QE/100 gram.	Spektrofotometri UV-Vis	Nilai Absorbansi	Rasio
---------------------------	--	-------------------------	------------------	-------

F. Alat dan bahan

1. Alat

Alat yang digunakan yaitu timbangan analitik, Oven, *Blender*, Ayakan, Pisau dan gunting, Desikator, Erlenmeyer, *Beaker glass*, Gelas ukur, Corong kaca, Kertas saring, Pengaduk kaca, Rotari evaporator, Cawan porselin, *Waterbath*, Spektrofotometer UV-Vis, Kuvet, Pipet volum, Pipet ukur, Labu ukur, Tabung reaksi dan rak tabung reaksi, Kertas perkamen, Aluminium foil, Label, dan Tisu.

2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu daun kelor, kulit batang kelor, aquadest, etanol 70%, etanol 95%, serbuk aluminium klorida (AlCl_3), natrium asetat (CH_3COONa), kuersetin.

G. Presedur kerja

1. Pembuatan simplisia

Tahapan awal penelitian diawali dengan pengumpulan bahan baku berupa batang dan daun kelor (*Moringa oleifera L.*). Batang kelor selanjutnya dikupas untuk memisahkan kulit batang dari bagian kayunya, kemudian dilakukan sortasi basah. Daun kelor juga mengalami sortasi basah untuk

memisahkan bagian yang rusak atau tercemar. Tahap berikutnya adalah pencucian bahan menggunakan air bersih untuk menghilangkan sisa tanah dan kotoran yang melekat. Setelah pencucian, bahan ditiriskan hingga air tidak menetes lagi, kemudian dilanjutkan dengan proses pengeringan. Kulit batang kelor dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60°C selama 24 jam, sedangkan daun kelor dikeringkan hingga mencapai kondisi kering dibawah sinar matahari langsung. Setelah proses pengeringan, dilakukan sortasi kering untuk memastikan tidak terdapat kotoran atau bahan asing. Selanjutnya, simplisia kulit batang dan daun kelor yang telah kering dihaluskan menggunakan *blender*, kemudian diayak dengan ayakan mesh 45 hingga diperoleh serbuk simplisia halus (Ifada *et al.*, 2024).

2. Pembuatan Ekstrak

Proses ekstraksi kulit batang dan daun kelor (*Moringa Oleifera L*) dilakukan dengan metode maserasi menggunakan perbandingan bahan dan pelarut sebesar 1:7,5. Sebanyak 200 gram serbuk simplisia kulit batang kelor kering dimasukkan ke dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan 1.500 mL pelarut etanol 70% hingga seluruh bahan terendam sempurna. Prosedur yang sama dilakukan terhadap serbuk simplisia daun kelor. Selanjutnya, campuran disimpan di tempat yang terlindung dari paparan cahaya matahari dan didiamkan selama $\pm 3-5$ hari dengan pengadukan sesekali untuk meningkatkan proses penarikan senyawa aktif (Ifada *et al.*, 2024).

Setelah proses maserasi pertama selesai, larutan disaring untuk memisahkan ampas dan filtrat. Ampas hasil penyaringan kemudian dimaserasi kembali

(remaserasi) dengan penambahan pelarut etanol 70% $\pm$ 500 mL hingga seluruh ampas terendam, lalu disimpan selama $\pm$ 2–3 hari dengan pengadukan sesekali. Setelah remaserasi selesai, larutan kembali disaring dan filtrat hasil maserasi pertama dan remaserasi digabungkan (Ifada *et al.*, 2024).

Filtrat gabungan selanjutnya dikumpulkan dalam cawan porselen dan diuapkan menggunakan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental kulit batang dan daun kelor (Ifada *et al.*, 2024).

3. Skrining Fitokimia

a. Identifikasi flavonoid

Identifikasi flavonoid dilakukan karena senyawa ini memiliki berbagai aktivitas biologis, antara lain sebagai antimutagenik, antiinflamasi, antioksidan, serta antikarsinogenik. Selain itu, flavonoid juga berperan dalam pengaturan fungsi enzim utama di dalam sel (Yulia *et al.*, 2022).

Sebanyak 1 gram ekstrak sampel ditambahkan 5 mL etanol 70%, kemudian dikocok dan dipanaskan. Setelah itu, larutan dikocok kembali dan disaring. Filtrat yang diperoleh dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai blanko, sedangkan tabung kedua ditambahkan 0,5 gram serbuk magnesium dan tiga tetes HCl. Perubahan warna menjadi kuning hingga merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Kariem dan Maesaroh, 2022).

4. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Kelor (*Moringa Oleifera L*)

a. Pembuatan larutan kuersetin primer

Kuersetin digunakan sebagai standar karena merupakan senyawa flavonoid yang umum dijadikan pembanding. Sebanyak 10 mg volume 100 mL untuk memperoleh larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan ini selanjutnya diencerkan untuk memperoleh seri konsentrasi tertentu kuersetin ditimbang, kemudian dilarutkan dalam etanol 70% hingga yang digunakan dalam pembuatan kurva baku (Acharjee *et al.*, 2018).

b. Penentuan kurva baku kuersetin dilakukan dengan menyiapkan larutan kuersetin dalam etanol pada konsentrasi 15, 30, 45, 60, dan 90 ppm. Dari setiap konsentrasi tersebut, larutan standar kuersetin dipipet ke dalam vial. Selanjutnya penentuan panjang gelombang maksimum. Larutan standar kuersetin diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan referensi kuersetin 50 µg/mL pada rentang panjang gelombang tertentu untuk menentukan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}). Panjang gelombang maksimum yang diperoleh digunakan sebagai acuan dalam seluruh pengukuran absorbansi sampel dan larutan standar (Acharjee *et al.*, 2018).

c. Penentuan waktu operasi

Penentuan waktu operasi dilakukan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan hingga reaksi antara flavonoid dengan pereaksi AlCl_3

menghasilkan warna yang stabil. Pengukuran dilakukan dalam waktu 30 menit setelah penambahan pereaksi, sehingga hasil absorbansi yang diperoleh bersifat optimal dan konsisten (Acharjee *et al.*, 2018).

d. Penentuan kurva baku kuersetin

ditambahkan larutan AlCl_3 10% sebanyak 0,1 mL, natrium asetat 0,1 mL, aquadest 2,8 mL, serta etanol 70% sebanyak 1,5 mL. Campuran kemudian diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Nilai absorbansi yang diperoleh selanjutnya dikorelasikan dengan konsentrasi larutan standar kuersetin untuk membentuk kurva kalibrasi dan ditentukan persamaan regresi linier ($y = bx + a$). Persamaan regresi tersebut digunakan untuk menghitung konsentrasi ekstrak dengan memasukkan nilai absorbansi (y) ke dalam persamaan yang dihasilkan (Acharjee *et al.*, 2018).

e. Penentuan kandungan flavonoid total (Acharjee *et al.*, 2018)

- 1) Sebanyak 0,2 g ekstrak etanol ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 25 mL etanol 70%.
- 2) Larutan ekstrak dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer, selanjutnya ditambahkan etanol 70% dan diaduk menggunakan pengaduk magnetik hingga diperoleh larutan yang homogen. Larutan kemudian disaring ke dalam labu ukur 25 mL, kertas saring dibilas dengan etanol, dan volume larutan disesuaikan hingga tanda batas menggunakan etanol.

- 3) Selanjutnya, sebanyak 0,5 mL larutan dari masing-masing ekstrak dipipet ke dalam vial, kemudian ditambahkan 2,8 mL aquades, 0,1 mL larutan AlCl_3 10%, 0,1 mL natrium asetat, serta 1,5 mL etanol 70%.
- 4) Campuran yang diperoleh selanjutnya diukur nilai absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.
- 5) Nilai absorbansi yang diperoleh digunakan dalam persamaan regresi dari kurva baku kuersetin,
- 6) kemudian kadar flavonoid total dihitung berdasarkan rumus yang telah ditentukan.

H. Analisis data

1. Penentuan kadar flavonoid

Kadar flavonoid dihitung berdasarkan nilai kurva kalibrasi Spektrofotometer UV-Vis dan persamaan regresi linier menggunakan hukum Lambert-Beer seperti pada persamaan berikut:

$$y = ax + b$$

Kandungan flavonoid total diperoleh dengan memasukkan data absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva standar kuersetin dengan menggunakan absorbansi sebagai nilai y dan x sebagai konsentrasi kuersetin dalam ppm menggunakan rumus yang digunakan:

$$C = \frac{y-a}{b}$$

Keterangan:

C : Konsentrasi Kadar Flavonoid Total dalam Sampel

y : Absorbansi ekstrak/ sampel

a : intersep/ absorbansi awal (saat nilai konsentrasi ekstrak masih 0)

b : slope/ kemiringan garis/ kurva

gram: Berat Sampel

2. Analisis perbandingan

Analisis perbandingan kadar senyawa flavonoid pada bagian daun dan kulit batang kelor dilakukan menggunakan uji statistik *One Way Anova* dengan bantuan perangkat lunak SPSS. Pada analisis ini, kadar flavonoid dijadikan sebagai variabel terikat, sedangkan bagian tanaman kelor (daun dan kulit batang) ditetapkan sebagai variabel bebas. Sebelum dilakukan pengujian anova, terlebih dahulu dilakukan uji homogenitas varians untuk memastikan bahwa data yang diperoleh bersifat homogen. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui keseragaman varians data sebagai salah satu syarat analisis statistik parametrik.

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

H₀: Tidak terdapat perbedaan yang signifikan kadar senyawa flavonoid antara bagian daun dan kulit batang kelor ($p > 0,05$).

H₁: Terdapat perbedaan yang signifikan kadar senyawa flavonoid antara bagian daun dan kulit batang kelor ($p < 0,05$).

Berdasarkan hasil uji homogenitas varians, apabila nilai signifikansi lebih besar dari 0,05, maka data dinyatakan homogen dan dapat dilanjutkan ke uji anova. Selanjutnya, hasil uji anova digunakan untuk menentukan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan kadar flavonoid pada ekstrak daun dan kulit batang kelor.

Oleh karena itu, uji anova digunakan dalam penelitian ini karena metode tersebut mampu menganalisis perbedaan rata-rata kadar flavonoid antar kelompok sampel secara statistik untuk menentukan apakah perbedaan yang diperoleh bersifat signifikan atau hanya terjadi karena variasi acak. Dengan menggunakan anova, data hasil pengukuran kadar flavonoid dari masing-masing kelompok perlakuan (bagian daun dan kulit batang kelor) dapat dibandingkan secara objektif dalam satu model pengujian dengan mempertimbangkan variasi dalam dan antar kelompok. Uji ini sesuai digunakan pada data numerik berdistribusi normal dan homogen, sehingga dapat memberikan dasar pengambilan keputusan yang lebih akurat terhadap hipotesis penelitian mengenai ada atau tidaknya perbedaan signifikan kadar flavonoid antar bagian tanaman yang diuji.