BAB III
METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitiam

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperiment.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) yang berada Liliba, Kota Kupang, Nusa Tenggara Timur.

2. Sampel dan teknik sampling

a. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sambiloto (*Andrographis paniculata*), dimana daun tersebut diambil dari Liliba, Kecamatan Oebobo, Nusa Tenggara Timur.

b. Teknik sampling

Teknik sampling dalam penelitian ini menggunakan teknik *purposive sampling*, dengan kriteria sampel berupa daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) yang masih segar dan berwarna hijau.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia, Teknologi Sediaan Farmasi dan Farmasi Bahan Alam di Program studi D-III Farmasi, Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan April sampai Mei 2025.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun sambiloto (Andrographis paniculata) 100 ppm, 200 ppm dan 300 ppm.

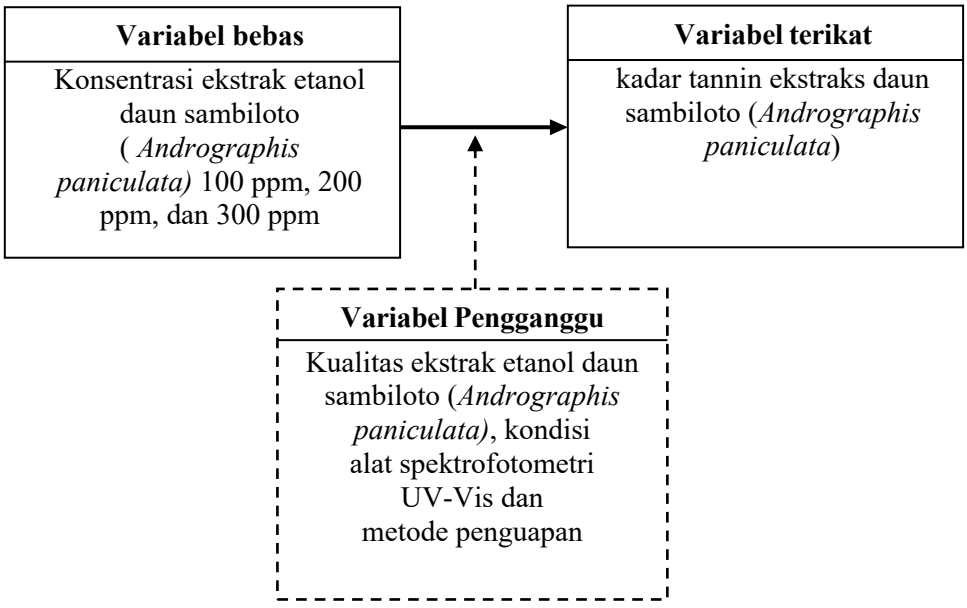
2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah kadar tanin total pada daun sambiloto (*Andrographis paniculata*).

3. Variabel penganggu

Variabel pengganggu adalah kualitas ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata*), kondisi alat spektrofotometri UV-Vis dan metode penguapan.

E. Kerangka Konsep



Gambar 3. Hubungan antar variabel

Keterangan

———— : Yang diteliti
- - - - - - - : Tidak diteliti

F. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi operasional	Alat Ukur	Skala
1	Daun sambiloto (*Andrographis paniculata*)	Daun tunggal berbentuk segi empat, berwarna hijau tua dan hijau muda.		Nominal
2	Ekstrak Etanol	Ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) diperoleh melalui proses maserasi menggunakan pelarut etanol 95%, kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 60 °C dan selanjutnya diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu 50 °C.		Nominal
3	Kadar tanin	Ekstrak etanol 95% daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) 50 mg dalam 50 ml akuades diencerkan. Reagen *Folin ciocalteu* (0,5 ml) ditambahkan, dikocok, dan didiamkan 5 menit. Setelah penambahan Na_2CO_3 15% (1 ml), campuran dikocok, didiamkan 5 menit, diencerkan hingga 10 ml, dan dibiarkan hingga stabil.	Spektrofotommeter UV-Vis	Rasio

G. Prosedur Penelitian

1. Alat dan bahan

a. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-2600), neraca digital dan analitik, bejana untuk maserasi, *herbs grinder* MKS-ML200, batang pengaduk (Pyrex), cawan porselen, pipet tetes, corong, *waterbath*, *rotary evaporator*, aluminium foil, tabung reaksi beserta rak dan penjepitnya, plat tetes, kaca arloji, sendok tanduk, kertas perkamen,

labu ukur 50 mL dan 100 mL (IWAKI), vial, mikropipet, gelas beaker 250 mL (Pyrex), serta kain saring berwarna putih.

b. Bahan

Bahan yang dipakai meliputi daun sambiloto (*Andrographis paniculata*), asam galat, reagen *Folin ciocalteu*, etanol 95%, HCl pekat, bubuk magnesium, Pereaksi Mayer, Pereaksi Dragendorff, FeCl3 1%, Na2CO3 15% dan aquadest.

2. Pengambilan sampel

Pengambilan tanaman dilakukan secara manual dengan memilih daun segar dari tumbuhan sambiloto (*Andrographis paniculata*) sebanyak 2 kg. Daun sambiloto tersebut diperoleh dari wilayah Kelurahan Liliba, Kecamatan Oebobo, Kota Kupang.

3. Pembuatan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*)

Sortasi basah bertujuan untuk menyingkirkan kotoran serta barang asing lain dari tanaman sebelum proses pencucian dan pengeringan. Pada proses ini, bagian yang tidak diperlukan dari tanaman dibuang, meninggalkan hanya daun-daun berkualitas baik. Proses pencucian dilakukan untuk membersihkan kotoran dari tanaman menggunakan air yang mengalir. Perajangan, pada tahap ini daun dipisahkan dari tulang daun untuk mempercepat pengeringan dan penyerbukan. Pengeringan, pada tahap ini simplisia dijemur tidak terkena matahari langsung (menggunakan kain hitam) agar zat berkhasiatnya tidak hilang. Sortasi kering, tahap ini dilakukan untuk memisahkan benda-benda asing,

seperti bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lainnya, dari simplisia yang sudah dikeringkan.Setelah semua proses dilewati, simplisia tersebur diserbukkan dan di ayak dengan ayakan nomor 16. Serbuk tersebut disimpan di dalam botol (Rivai *et al*.,2014).

4. Pembuatan ekstrak

Pada metode ini, sebanyak 200 gram serbuk daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) diekstraksi menggunakan 2 liter etanol 95%. Proses maserasi dilakukan dengan melarutkan 200 gram serbuk dalam 1,5 liter etanol (¾ dari total pelarut), kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca yang ditutup dengan aluminium foil dan disimpan pada suhu ruang selama 3 hari, sambil diaduk setiap 8 jam. Setelah 3 hari, campuran disaring untuk memperoleh maserat pertama. Ampas yang tersisa kemudian diekstraksi kembali (remaserasi) dengan sisa pelarut etanol sebanyak 0,5 liter selama 2 hari. Setelah proses kedua selesai, hasilnya kembali disaring untuk mendapatkan maserat kedua. Kedua maserat kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator pada kondisi tertentu (70 rpm, 60°C), lalu dikentalkan dengan *waterbath*. Ekstrak akhir ditutup rapat dengan aluminium foil dan disimpan dalam lemari pendingin.

$$\%\ Redemen\ ekstrak = \frac{bobot\ ekstrak\ kental}{bobot\ total\ simplisa} \times 100\%$$

5. Identifikasi fitokimia

a. Alkaloid

Sebanyak 0,3 gram ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) dilarutkan dalam 5 mL HCl, lalu dipanaskan menggunakan penangas air. Setelah itu, larutan disaring dan filtratnya dikumpulkan. Sebanyak 1 mL dari filtrat tersebut dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi yang berbeda, lalu masing-masing ditambahkan 1 mL pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Terbentuknya endapan menunjukkan keberadaan senyawa alkaloid, dengan warna khas yaitu putih untuk Mayer, kuning untuk Wagner, dan jingga untuk Dragendorff *(*Wahyuni *et al*., 2020)

b. Flavonoid

Sebanyak 0,3 gram ekstrak daun sambiloto (*Andrographys paniculata*) dilarutkan dalam 5 ml etanol. Kemudian, larutan tersebut ditambahkan dengan beberapa tetes HCl pekat dan 1,5 gram magnesium. Reaksi positif ditandai dengan timbulnya warna merah, yang menunjukkan adanya flavonoid (Akasia *et al*., 2021).

c. Tanin

Sebanyak 200 mg ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) dilarutkan dalam 5 mL etanol, kemudian ditambahkan 2 mL larutan $FeCl_3$ 1%. Perubahan warna menjadi biru tua, biru kehitaman, atau hitam kehijauan menandakan adanya kandungan

tanin dalam ekstrak tersebut (Rubianti *et al*.,2022)

6. Penetapan kadar tanin total

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Sebanyak 10 mg asam galat dilarutkan dalam akuades dan diencerkan hingga volume 100 ml, menghasilkan larutan baku dengan konsentrasi 100 ppm.

b. Penentuan waktu stabil

Larutan induk asam galat dengan konsentrasi 4 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, lalu ditambahkan 0,5 mL reagen Folin-Ciocalteu. Campuran dikocok dan didiamkan selama 5 menit. Setelah itu, ditambahkan 1 mL larutan Na_2CO_3 15%, dikocok hingga homogen, dan kembali didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya, dilakukan pemindaian menggunakan spektrofotometer dalam rentang panjang gelombang 300–800 nm. Hasil analisis menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum standar asam galat berada pada 765 nm (λmaks = 765 nm). Setelah itu, dilakukan pemindaian waktu (*time scan*) selama 110 menit pada panjang gelombang tersebut (Mulyani *et al*.,2022).

c. Pembuatan kurva baku asam galat

Larutan standar asam galat dengan konsentrasi 1 ppm hingga 6 ppm (1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, dan 6 ppm) disiapkan dengan cara memipet volume tertentu dari larutan induk di masukkan dalam labu ukur 10 mL. Reagen *Folin ciocalteu* sebanyak 0,5 ml ditambahkan, campuran dikocok dan didiamkan selama 5 menit. Setelah itu, 1 ml larutan Na_2CO_3 15%

ditambahkan, dikocok hingga homogen, dan didiamkan selama 5 menit. Volume akhir larutan di dalam labu ukur kemudian dicukupkan menjadi 10 ml dengan penambahan akuades, dikocok hingga homogen, dan didiamkan selama 90 menit. Absorbansi larutan ini diukur pada panjang gelombang maksimum (Noviyanty *et al*., 2020).

d. Penetapan kadar tanin total

Sebuah larutan ekstrak etanol 95% dari daun sambiloto (Andrographis paniculata) dibuat dengan melarutkan 50 mg ekstrak dalam 50 ml aquadest. Sebuah volume tertentu yang mengandung konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm dari larutan ekstrak dipipet, diikuti dengan penambahan 0,5 ml reagen Folin-Ciocalteu dikocok, didiamkan selama 5 menit, yang kemudian dicampur dan dibiarkan selama 5 menit. Volume larutan kemudian ditingkatkan menjadi 10 ml dengan penambahan akuades dan dibiarkan pada rentang waktu stabil yang telah ditentukan. Absorbansi ekstrak diukur pada panjang gelombang 725 nm-765 nm. Konsentrasi yang diperoleh kemudian direplikasi sebanyak dua kali. Kadar tanin total dihitung ekivalen dengan asam galat (Gallic Acid Equivalent/GAE) (Mulyani *et al*., 2022).

H. Analisi Data

Penentuan kadar tanin total dilakukan berdasarkan persamaan regresi linier atau melalui perhitungan kadar ekivalen tanin (Kurniawati *et al*., 2024)

$$\mathbf{Y = aX + b}$$

Ket

Y = Absorbansi sampel ekstrak yang diukur.

X = Konsentrasi tanin total dalam sampel (dalam GAE, misalnya mg GAE/g atau mg GAE/mL), inilah yang ingin Anda cari.

a = Slope (kemiringan) dari kurva baku standar asam galat.

b = Intercept (titik potong) dari kurva baku standar asam galat.

Dilanjutkan dengan perhitungan kadar tanin menggunakan rumus :

$$\%\ \text{Tanin} = \frac{CxVxfpx10^{-6}}{m}\ x\ 100\%$$

Keterangan :

C = Konsentrasi tanin hasil dari spektrofotometri (µg/mL)

V = volume sampel (mL)

Fp = Faktor pengenceran

10^{-6} = Konversi dari mikrogram ke gram (µg → g)

M = bobot sampel (g)