

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis penelitian**

Jenis penelitian ini merupakan eksperimental laboratorium untuk mengetahui pengaruh dari metode ekstraksi yang digunakan terhadap kadar tanin kemudian membandingkan kadar tanin ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dengan variasi metode ekstraksi secara maserasi yang dilanjutkan dengan ekstraksi cair-cair (corong pisah) dan metode ekstraksi secara refluks.

#### **3.2 Waktu dan Tempat penelitian**

Penelitian dilakukan pada tanggal 13 Januari – 28 Februari 2022 di Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

#### **3.3 Bahan dan Alat**

##### **3.3.1 Bahan**

Bahan-bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini antara lain daun belimbing wuluh, aquades, aseton, kloroform, asam askorbat, pereaksi follin denis, natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) jenuh, kertas saring.

##### **3.3.2 Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain neraca analitik, oven, blender, pisau, waterbath, corong pisah, corong gelas, beaker glass 1000 mL, kaca arloji, pipet ukur, pipet tetes, bola hisap, batang pengaduk, labu didih, klem, statif, kondensor, hot plate, batu didih, botol vial, kuvet, spektrofotometer UV-Vis.

#### **3.4 Variabel Penelitian**

##### **3.4.1 Variabel bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*), yaitu metode ekstraksi maserasi yang dilanjutkan ekstraksi cair-cair dan metode ekstraksi berdasarkan standar AOAC yaitu refluks.

### 3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar tanin yang diperoleh dari pengekstrakkan daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) secara maserasi dan refluks.

### 3.5 Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel**

Variabel	Definisi	Metode	Alat Ukur	Skala
Metode ekstraksi	- Merupakan proses ekstraksi yang dilakukan berkelanjutan menggunakan 2 metode ekstraksi yaitu dari proses maserasi yang merupakan ekstraksi dengan cara perendaman dan dilanjutkan dengan ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah.	- Maserasi dan ekstraksi cair-cair (corong pisah)		
	- Merupakan metode ekstraksi yang melibatkan pemanasan serta	- Refluks		

	dilakukan pada titik didih pelarut dengan waktu tertentu serta adanya pendingin balik.			
Kadar tanin	Nilai kadar yang diperoleh dari ekstrak belimbing wuluh dengan metode ekstraksi yang berbeda yang diukur menggunakan alat Spektrofotometer UV-Vis.	Spektrofotometri UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Preparasi Daun Belimbing Wuluh

Dipetik daun belimbing wuluh dan dikumpulkan serta dipisahkan batang dengan daunnya. Kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran pada tanaman dan dilanjutkan dengan pencucian menggunakan air bersih. Selanjutnya dilakukan proses perajangan daun belimbing wuluh agar mempermudah proses pengeringan. Bahan yang sudah dirajang diangin-anginkan kemudian di oven dengan suhu  $36,7^{\circ}\text{C}$ . setelah itu simplisia diblender menggunakan grinder sampai diperoleh serbuk. Simplisia yang sudah menjadi serbuk diayak menggunakan mesh ukuran 50. Serbuk yang sudah halus digunakan untuk ekstraksi (Rahmadani, 2020).

#### 3.6.2 Ekstraksi Maserasi Daun Belimbing Wuluh

Ditimbang simplisia daun belimbing wuluh berupa serbuk menggunakan neraca analitik sebanyak 50 g. Kemudian serbuk yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam bejana dan ditambahkan dengan pelarut

aseton : air dengan perbandingan 7:3 sebanyak 400 mL. Selanjutnya ditambahkan asam askorbat 0,01 M sebanyak 3 mL. Proses perendaman dilakukan selama 3 hari dengan sesekali pengadukan. Hasil yang diperoleh dari proses perendaman kemudian disaring hingga diperoleh filtrat dari ekstrak belimbing wuluh. Selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan waterbath pada suhu 60 °C. Kemudian ekstrak yang diperoleh dilanjutkan dengan ekstraksi cair-cair (dimodifikasi dari Rahmadani, 2020).

### **3.6.3 Ekstraksi Cair-cair Daun Belimbing Wuluh**

Hasil ekstrak cair yang diperoleh sebelumnya dilakukan proses ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah menggunakan pelarut kloroform sebanyak 25 mL. Kemudian dilakukan penggojokan sampai terbentuk 2 fasa atau lapisan. Lapisan air yang berada diatas dipisahkan dengan lapisan kloroform yang berada dibawah. Selanjutnya lapisan air yang diperoleh dipekatkan menggunakan waterbath pada suhu 60 °C. Metode ini dimodifikasi dari penelitian Rahmadani (2020).

### **3.6.4 Ekstraksi Refluks Daun Belimbing Wuluh**

Dimasukkan 2 g simplisia belimbing wuluh yang sudah halus ke dalam erlenmeyer didih. Kemudian ditambahkan pelarut akuades sebanyak 50 mL dan direfluks selama 30 menit dihitung sejak campuran akuades mendidih. Setelah 30 menit didinginkan terlebih dahulu (AOAC, 2005)

### **3.6.5 Uji Kadar Tanin Daun Belimbing Wuluh dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis**

#### **a. Pembuatan Kurva Baku**

Dilakukan dengan membuat larutan standar asam tanat dengan konsentrasi 5 ppm; 10 ppm; 15 ppm; 20 ppm; 30 ppm; dan 40 ppm. Larutan standar ini dibuat dengan memipet larutan induk asam tanat 100 ppm masing-masing sebanyak 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL; 3 mL dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 ml. Setelah itu masing-masing larutan standar dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam botol vial. Kemudian ditambahkan pereaksi folin denis sebanyak 1,25 mL dan didiamkan selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 2,5 mL

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  jenuh. Setelah itu didiamkan larutan selama 30 menit kemudian dilakukan pengukuran absorbansinya menggunakan alat spektrofotometer uv-vis.

b. Preparasi Sampel Ekstrak Hasil Maserasi dan Ekstraksi Cair-cair

Ditimbang ekstrak belimbing wuluh sebanyak 0,02 g menggunakan neraca analitik. Kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades dalam beaker glass. Selanjutnya larutan sampel dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam botol vial (Rahmadani, 2020). Lalu ditambahkan pereaksi folin denis sebanyak 1,25 mL dan didiamkan selama 5 menit kemudian ditambahkan larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  jenuh sebanyak 2,5 mL didiamkan selama 30 menit. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan alat spektrofotometer uv-vis dengan panjang gelombang 752 nm (AOAC, 2005).

c. Preparasi Sampel Ekstrak Hasil Refluks

Hasil refluks dilakukan penyaringan. Kemudian dipindahkan ke labu ukur 100 ml dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Dipipet filtrat hasil ekstraksi sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL diencerkan menggunakan akuades. Dipipet 1 mL dan dimasukkan ke dalam vial dan ditambahkan pereaksi folin denis sebanyak 1,25 mL kemudian diinkubasi sampel di tempat gelap selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 2,5 mL larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  jenuh. Setelah itu diinkubasi larutan di tempat gelap selama 30 menit kemudian dilakukan pengukuran absorbansinya menggunakan alat spektrofotometer uv-vis dengan panjang gelombang 752 nm (AOAC, 2005).

### 3.7 Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah kadar dari ekstrak belimbing wuluh yang telah diberi perlakuan berbeda pada tahapan proses ekstraksi yaitu metode ekstraksi maserasi yang dilanjutkan dengan ekstraksi cair-cair serta metode ekstraksi refluks berdasarkan standar dari AOAC yang kemudian diolah data menggunakan uji statistik *One Way Anova* untuk mengetahui adanya perbedaan pada masing-masing hasil kadar.

Penyajian data dengan bentuk tabel seperti pada tabel berikut.

**Tabel 3. 2 Penyajian Kadar Tanin Ekstrak Daun Belimbing Wuluh**  
(*Averrhoa bilimbi L.*)

Metode Ekstraksi	Replikasi	Kadar Tanin (%b/b)	Rata-rata (%)
Maserasi + ekstraksi cair-cair	1		
	2		
	3		
Refluks	1		
	2		
	3		

Pada penentuan kadar tanin ekstrak belimbing wuluh dari 2 metode ekstraksi yang berbeda dilakukan perhitungan dengan cara yang sama yaitu menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh dari kurva baku sebagai berikut.

$$y = ax + b$$

Keterangan :

y = absorbansi

a = slope

x = konsentrasi sampel

b = intersep

Dari persamaan berikut diperoleh konsentrasi sampel dengan cara mensubstitusikan nilai y (absorbansi) pada persamaan yang diperoleh. Kemudian dilakukan perhitungan kadar tanin dengan rumus sebagai berikut (Rahmadani, 2020).

$$\text{Kadar Tanin} = \frac{\text{konsentrasi (mg/L)} \times v \text{ total sampel (L)} \times fp}{\text{berat sampel (g)}}$$

Keterangan

Fp = faktor pengenceran