

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Obyek Penelitian

Obyek pada penelitian ini adalah ekstrak propolis lebah *Heterotrigona itama* dan propolis lebah *Tetragonula biroi* yang diambil dari kota Samarinda, Kalimantan Timur, Indonesia.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya alat-alat gelas (model: iwaki), *waterbath* listrik (model: faithful), Spektrofotometri uv-visible (model: evolution 201), *vortex mixer* (model: scilogex mx-5), oven (model: labtech LDO-100E), kompor listrik (model: maspion S302), penangas ultrasonik, *magnetic stirrer*.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah propolis dari lebah *Heterotrigona itama* yang diambil dari kota Samarinda, propolis dari lebah *Tetragonula biroi* yang diambil dari kota Samarinda, akuades, etanol 70%, etanol 96%, kloroform, kuersetin, asam galat, natrium karbonat 10%, aluminium klorida 10%, pereaksi mayer, pereaksi Liebermann-Burchard, NaOH, ferri klorida 5%, pereaksi Folin-Ciocalteu 10%, dapar fosfat, natrium agar.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Penyiapan Sampel

Propolis dihancurkan hingga menjadi ukuran yang lebih kecil. Sejumlah propolis dimaserasi menggunakan etanol 70%. Propolis ditambahkan pelarut etanol hingga semua propolis terendam sempurna. Propolis diaduk dan ditekan-tekan lalu didiamkan selama 24 jam dan di remaserasi setiap 24 jam. Disaring air hasil maserasi lalu di *waterbath* pada suhu 60°C hingga terbentuk ekstrak kental.

2.3.2 Standarisasi Ekstrak Parameter Spesifik

Standarisasi ekstrak parameter spesifik yang dilakukan meliputi uji organoleptik ekstrak, kadar senyawa yang larut dalam air, dan kadar senyawa yang larut dalam etanol (Marpaung & Septiyani, 2020).

A. Organoleptik Ekstrak

Penetapan organoleptik pada ekstrak meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa.

B. Kadar Senyawa Yang Larut Dalam Air

Maserasi sejumlah ekstrak propolis hingga 24 jam dengan menggunakan 50 ml air kloroform pada labu tersumbat selama 6 jam pertama labu digojok beberapa kali dan kemudian didiamkan selama 18 jam. Disaring hasil maserasi lalu uapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, residu dipanaskan dengan suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung terhadap ekstrak awal. Kadar senyawa yang larut dalam air dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{kadar senyawa larut air (g/g)} = \frac{\text{berat sari larut air}}{\text{berat bahan awal}} \times \frac{50}{20} \times 100\%$$

C. Kadar Senyawa Yang Larut Dalam Etanol

Maserasi sejumlah ekstrak propolis hingga 24 jam dengan menggunakan 50 ml etanol (96%) pada labu tersumbat selama 6 jam pertama labu digojok beberapa kali dan kemudian didiamkan selama 18 jam. Disaring hasil maserasi lalu uapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, residu dipanaskan dengan suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung terhadap ekstrak awal. Kadar senyawa yang larut dalam etanol dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{kadar senyawa larut etanol (g/g)} = \frac{\text{berat sari larut etanol}}{\text{berat bahan awal}} \times \frac{50}{20} \times 100\%$$

2.3.3 Standarisasi Ekstrak Parameter Non-Spesifik

Standarisasi ekstrak pada parameter non-spesifik yang dilakukan meliputi uji penetapan susut pengeringan, penetapan bobot jenis, penetapan kadar air, penetapan kadar abu, cemaran logam, dan cemaran mikroba (Marpaung & Septiyani, 2020).

A. Penetapan susut pengeringan

Ditimbang seksama 1-2 g ekstrak dalam botol timbang dangkal tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Bahan dalam botol diratakan dengan menggoyangkan botol hingga lapisan sampel/ekstrak setelah \pm 5-10 mm. Kemudian dimasukkan dalam ruang pengering (oven) dengan tutup dibuka. Dikeringkan hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan, botol dibiarkan dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu ruang. Dihitung berat kadar susut pengeringan dengan menggunakan rumus:

$$\text{susut pengeringan} = \frac{\text{berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

B. Penetapan bobot jenis

Bobot jenis ekstrak cair diukur dengan menggunakan piknometer kosong dan kering (W1) yang telah dikalibrasi, dengan menetapkan bobot piknometer kosong dan bobot air pada suhu 25°C (W2). Piknometer di isi ekstrak cair dan suhu dikondisikan pada 25°C, kemudian piknometer ditimbang. Bobot piknometer yang telah di isi ekstrak cair (W3) kemudian dikurangi bobot piknometer kosong. Bobot jenis ekstrak cair merupakan perbandingan antara bobot jenis ekstrak dengan bobot air, pada suhu 25°C. Bobot jenis ekstrak dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Bobot jenis} = \frac{W3 - W1}{W2 - W1}$$

C. Penetapan kadar air

Sejumlah ekstrak propolis ditimbang dalam wadah yang ditara. Dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam di dalam oven dan ditimbang. Dilanjutkan dengan pengeringan dan ditimbang pada jarak 1 jam hingga perbedaan antara 2 penimbangan secara berturut-turut tidak lebih dari 0,25%. Penetapan kadar air dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar air} = \frac{W}{W1} \times 100\%$$

W : bobot sampel sebelum dikeringkan, dalam gram

W1 : Kehilangan bobot sampel di oven, dalam gram

D. Penetapan kadar abu

Sejumlah ekstrak propolis ditimbang, dimasukkan ke dalam cawan porselen yang bobotnya telah diketahui. Arangkan di atas nyala pembakar, kemudian abukan dalam tanur listrik pada suhu maksimum 550°C sampai pengabuan sempurna. Dinginkan dalam eksikator, timbang hingga bobot tetap. Penetapan kadar air dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar abu} = \frac{W1 - W2}{W} \times 100\%$$

W : bobot sampel sebelum diabukan

W1 : bobot sampel + cawan sesudah diabukan

W2 : bobot cawan kosong

E. Cemaran logam

Kandungan logam berat dianalisis menggunakan spektrofotometri dan hamburan cahaya dengan pembandingan larutan baku timbal. Penetapan cemaran logam yang diperiksa yaitu merkuri, arsen, timbal, dan kadmium.

F. Cemaran mikroba

Analisis cemaran mikroba dilakukan menggunakan metode Angka Lempeng Total (ALT) dan Angka Kapang Khamir (AKK). Untuk menentukan ALT, sejumlah propolis ditambahkan ke dalam dapar fosfat (pH 7,2) hingga mencapai volume 10 mL. Selanjutnya, dilakukan pengenceran hingga mencapai 10⁻⁶. Dari setiap tingkat pengenceran, diambil 1 mL dan ditempatkan dalam cawan petri steril dalam tiga kali ulangan. Pada setiap cawan petri, ditambahkan 15-20 mL media perbenihan NA pada suhu 45±10°C. Jumlah koloni yang tumbuh pada inkubasi cawan petri yang ditempatkan secara terbalik selama 24 jam pada suhu 35-37°C digunakan untuk menyatakan ALT. Proses penentuan AKK dilakukan dengan prosedur serupa seperti ALT, tetapi menggunakan media perbenihan *Plate Count Agar* (PCA).

2.3.4 Uji Kandungan Ekstrak

Uji kandungan ekstrak dilakukan dengan metode kualitatif berdasarkan dari perubahan warna (Julianto, 2019).

Uji alkaloid, dimasukkan filtrat uji ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 1 – 2 tetes reagen Mayer ke dalam tabung. Jika terbentuk endapan putih atau kuning keruh pada larutan, maka ekstrak positif mengandung alkaloid.

Uji flavonoid, ditambahkan beberapa tetes NaOH ke dalam ekstrak cair yang telah dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Jika larutan mengalami perubahan warna menjadi kuning pekat, maka ekstrak positif mengandung flavonoid.

Uji fenolik, ekstrak dilarutkan dalam 5 mL akuades. Ditambahkan beberapa tetes ferri klorida 5% netral. Jika larutan menghasilkan warna hijau pekat hingga kehitaman, maka ekstrak positif mengandung fenolik.

Pada uji steroid/triterpenoid dan uji saponin dilakukan dengan metode kualitatif berdasarkan perubahan warna (Hidayah *et al.*, 2016).

Uji steroid/triterpenoid, 2 ml ekstrak etanol ditambahkan 2 ml n-heksana lalu dikocok. Tambahkan pereaksi Lieberman-Burchard. Ekstrak positif steroid ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi biru kehijauan. Ekstrak positif triterpenoid ditandai dengan perubahan warna menjadi merah-ungu.

Uji saponin, 2 ml akuades ditambahkan ke dalam 2 ml ekstrak etanol, kocok kuat dan ditambahkan HCl. Timbulnya busa yang stabil menandakan ekstrak positif saponin.

2.3.5 Penetapan Total Fenolik

Kandungan total fenolik atau *total phenolic content* (TPC) di uji secara kuantitatif dengan menggunakan folin ciocalteu sebagai reagen dan asam galat sebagai pembanding. Pembuatan standar induk asam galat dilakukan dengan menimbang 10 mg asam galat dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml. Ditambahkan 1 ml metanol, aduk hingga larut. Kemudian ditambahkan akuades hingga tanda dan homogenkan. Dibuat deret standar (0,5, 1, 2, 4, 8, dan 16) µg/ml dalam labu ukur 10 ml. Ditambahkan pereaksi Follin Ciocalteu 10% sebanyak 0,5 ml, dan didiamkan 3-8 menit. Ditambahkan pereaksi natrium karbonat 10% sebanyak 4 ml. Diaduk dengan *vortex mixer* hingga homogen. Diamkan selama 2 jam dan lindungi dari cahaya. Ukur absorban standar pada panjang gelombang larutan induk (754 nm). Pada larutan uji timbang 0,1 g ekstrak dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml. Tambahkan akuades hingga batas, homogenkan. Pipet 500 µg larutan tersebut dan dimasukkan dalam tabung reaksi 10 ml, lindungi dari cahaya. Tambahkan pereaksi folin ciocalteu 10% sebanyak 0,5 ml, diamkan 3 – 8 menit. Tambahkan pereaksi natrium karbonat 10 % sebanyak 3 ml. Aduk dengan *vortex mixer* hingga homogen. Diamkan selama 2 jam dan lindungi dari cahaya. Ukur absorban pada panjang gelombang 754 nm (Yusika *et al.*, 2023).

2.3.6 Penetapan Total Flavonoid

Kandungan total flavonoid atau *total flavonoid content* (TPC) di uji dengan metode kolorimetri menggunakan aluminium klorida dan kuersetin sebagai pembanding. Larutan uji dibuat dengan menimbang 0,1 g ekstrak dan dimasukkan ke dalam mikro tube. Tambahkan 1 ml metanol dan diaduk dengan *vortex mixer* hingga homogen. Disaring ke dalam labu ukur 10 ml, dan tambahkan etanol hingga tanda. Buat larutan pembanding dengan menimbang 5 mg kuersetin, dimasukkan ke dalam mikro tube dan ditambahkan metanol 1 ml. Buat seri pengenceran larutan pembanding dengan kadar 5, 10, 20, 40, dan 80 $\mu\text{g/ml}$. Pipet secara terpisah larutan uji dan masing-masing seri larutan pembanding ke dalam wadah yang sesuai, tambahkan pada masing-masing 750 μl aluminium klorida 2%. Kocok dan diamkan selama 1 jam dalam kondisi gelap. Ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum. Buat kurva kalibrasi dan hitung kadar larutan uji (Yusika *et al.*, 2023).