

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Subjek dan Obyek Penelitian

Pada obyek penelitian ini menggunakan sampel propolis dari lebah kelulut *Geniotrigona thoracica* dan *Tetragonula fuscobalteata* yang diperoleh dari Kota Samarinda, Kalimantan Timur.



Gambar 1. Propolis *Geniotrigona thoracica* **Gambar 2.** Propolis *Tetragonula fuscobalteata*

2.1.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu toples kaca, alat-alat gelas (Iwaki), spatula, *waterbath* (Faithful), neraca analitik, desikator, piknometer, cawan porselen, spektrofotometer UV-Vis (Evolution 201), *vortex mixer* (Scilogex mx-5), oven (Labtech LDO-100E). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu propolis *Geniotrigona thoracica* dan *Tetragonula fuscobalteata*, etanol, metanol, aquadest, kloroform, aluminium klorida, asam galat, quercetin, pereaksi (Folin Ciocalteu, Mayer, Anisaldehyd- H_2SO_4 , Dragendrof, NaOH, FeCl_3 , Lieberman-Burchard).

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1 Ekstraksi

Sampel propolis yang diperoleh dipisahkan dari madu dan pollen. Propolis dipotong kecil-kecil atau menjadi partikel yang lebih kecil. Masukkan propolis ke dalam toples kaca dan rendam dengan etanol 96% untuk kedua propolis sampai propolis terendam sempurna. Direndam selama 24 jam sambil sesekali diaduk, lalu disaring. Propolis diremaserasi sampai larutan ekstrak propolis bening dengan jumlah pelarut yang sama, lalu disaring. Semua hasil maserat dikumpulkan dan diuapkan dengan *waterbath* pada suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental. Dihitung kadar rendemen ekstrak dengan rumus (Wendersteyt et al., 2021):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{jumlah ekstrak kental}}{\text{jumlah berat kering}} \times 100\%$$

2.2.2 Standarisasi Ekstrak (*Parameter spesifik*)

Pada standarisasi ekstrak parameter spesifik yang meliputi uji kadar senyawa larut air dan uji kadar senyawa larut etanol dilakukan dengan metode menurut (Suryadini, 2019).

a. Organoleptik

Pengamatan organoleptik ekstrak meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa.

b. Uji Kadar Senyawa Larut Air

Di dalam labu yang tertutup, 5 gram ekstrak direndam dalam campuran air dan kloroform selama 24 jam. Selama periode 24 jam, campuran tersebut dikocok selama 6 jam pertama. Setelah itu, campuran didiamkan selama 18 jam tanpa gangguan.

Filtrat yang dihasilkan kemudian diuapkan hingga mengering menggunakan gelas evaporator kimia. Proses penguapan dilakukan dengan memanaskan hingga mencapai suhu 105°C. Pemanasan dilanjutkan hingga residu mencapai berat konstan. Hitung kandungan senyawa yang larut dalam air dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar senyawa larut air} = \frac{\text{berat sari larut air}}{\text{berat bahan awal}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

c. Uji Kadar Senyawa Larut Etanol

Maserasi 5 g ekstrak dalam 100 mL etanol 96% selama 24 jam dalam labu tertutup. Campuran dikocok selama 6 jam pertama dan didiamkan selama 18 jam. Filtrat yang dihasilkan kemudian diuapkan sampai kering menggunakan gelas kimia evaporator dan dipanaskan hingga suhu 105 °C hingga residu mencapai berat konstan. Hitung kandungan senyawa yang larut dalam etanol dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar senyawa larut etanol} = \frac{\text{berat sari larut etanol}}{\text{berat bahan awal}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

2.2.3 Standarisasi Ekstrak (*Parameter Non-Spesifik*)

a. Penetapan Susut Pengerinan

Pada penetapan susut pengerinan dan penetapan bobot jenis dilakukan dengan metode menurut (Suryadini, 2019):

Timbang 1 gram ekstrak menggunakan cawan, cawan tersebut sebelumnya dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan ditimbang sebelum penambahan ekstrak. Setelah menambahkan ekstrak, permukaan ekstrak diratakan dengan menggoyangkan cawan sehingga lapisannya mencapai ketebalan sekitar 5 mm - 10 mm. Kemudian, cawan yang berisi ekstrak dikeringkan pada suhu penetapan hingga mencapai bobot tetap. Lalu dinginkan cawan dalam desikator hingga mencapai suhu kamar:

$$\text{Susut pengerinan} = \frac{\text{berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

b. Penetapan Bobot Jenis

Untuk mengukur bobot jenis ekstrak cair, piknometer yang telah dikalibrasi digunakan. Tahap awal melibatkan penetapan bobot piknometer kosong dan bobot air pada suhu 25°C. Setelah itu, piknometer diisi dengan ekstrak cair, dan suhu kondisinya dipertahankan pada 25°C. Kemudian, piknometer ditimbang, dan hasilnya adalah selisih antara bobot piknometer yang telah diisi ekstrak cair dengan bobot piknometer kosong. Bobot jenis ekstrak cair dihitung dengan membandingkan bobot jenis ekstrak dengan bobot jenis air pada suhu 25°C. Penetapan bobot jenis dihitung menggunakan rumus:

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

W1 : bobot piknometer kosong

W2 : bobot piknometer kosong + air

W3 : bobot piknometer kosong + ekstrak cair

c. Penetapan Kadar Air

Langkah pertama adalah menimbang 10 gram ekstrak dalam wadah yang telah ditara. Kemudian, proses pengeringan dimulai dengan interval waktu 1 jam. Setelah setiap interval, ekstrak ditimbang kembali dengan syarat bahwa perbedaan antara dua

penimbangan berturut-turut tidak boleh lebih dari 0,25%. Penetapan kadar air dihitung menggunakan rumus (Wijaya et al., 2022):

$$\text{Kadar air} = \frac{W}{W_1} \times 100\%$$

W : bobot sampel sebelum dikeringkan

W₁ : kehilangan bobot sampel setelah oven

d. Kadar Abu

Sebanyak 2 - 3 gram ekstrak yang telah dipanaskan dan ditimbang sebelumnya ditempatkan dalam tanur. Proses pemanasan dilakukan secara perlahan dengan meningkatkan suhu secara bertahap hingga mencapai 550°C, hingga arang habis terbakar. Selanjutnya, ekstrak didinginkan dalam desikator untuk menghindari pengaruh kelembaban dan ditimbang kembali hingga mencapai bobot yang konstan. Kadar abu dihitung menggunakan rumus (Depkes RI, 2017):

$$\text{Kadar abu} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100\%$$

W : bobot sampel sebelum diabukan

W₁ : bobot sampel + cawan sesudah diabukan

W₂ : bobot cawan kosong

e. Cemaran Logam

Pada uji cemaran logam dan uji cemran mikroba dilakukan dengan metode menurut (Pratami et al., 2021):

Analisis cemaran logam berat dilakukan melalui dua metode, yaitu spektrofotometri dan hamburan cahaya, dengan menggunakan larutan baku timbal sebagai pembanding. Penetapan cemaran logam yang diuji melibatkan merkuri, arsen, timbal, dan kadmium.

f. Cemaran Mikroba

Untuk menganalisis cemaran mikroba, metode Angka Lempeng Total (ALT) dan Angka Kapang Khamir (AKK) digunakan. Dalam menentukan ALT, sejumlah propolis ditambahkan ke dalam dapar fosfat dengan pH 7,2 hingga mencapai volume 10 mL. Dilakukan pengenceran hingga mencapai tingkat 10⁶. Dari setiap tingkat pengenceran, diambil 1 mL dan ditempatkan dalam cawan petri steril sebanyak tiga kali ulangan. Pada setiap cawan petri, ditambahkan 15 - 20 mL media perbenihan NA pada suhu 45±10°C. Jumlah koloni yang tumbuh setelah cawan petri ditempatkan secara terbalik selama 24 jam pada suhu 35-37°C digunakan untuk menentukan ALT. Proses penentuan AKK dilakukan dengan prosedur serupa seperti ALT, namun menggunakan media perbenihan Plate Count Agar (PCA). Langkah-langkah ini penting dalam mengevaluasi keberadaan mikroba dan memastikan keamanan produk. Metode ALT dan AKK memberikan gambaran yang komprehensif tentang tingkat cemaran mikroba dan membantu dalam memastikan kepatuhan terhadap standar kualitas yang telah ditetapkan.

2.2.4 Uji Kandungan Kimia Ekstrak

a. Uji Fitokimia

Uji kandungan ekstrak dilakukan dengan metode kualitatif berdasarkan perubahan warna menurut (Julianto, 2019) dan (Hidayah et al., 2016).

Untuk uji Alkaloid, ekstrak kental dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu beberapa tetes pereaksi Mayer ditambahkan. Keberadaan alkaloid dapat terindikasi

dengan munculnya endapan putih atau larutan kuning keruh setelah penambahan reagen tersebut.

Untuk uji Fenolik, ekstrak kental diencerkan dalam 5 mL aquadest dan ditambahkan beberapa tetes ferri klorida 5% netral. Jika larutan menghasilkan warna hijau pekat, ekstrak dapat dianggap positif mengandung senyawa fenolik.

Untuk uji Flavonoid, ekstrak kental ditambahkan ke dalam tabung reaksi, diikuti dengan beberapa tetes pereaksi NaOH. Jika larutan menunjukkan warna kuning pekat, ekstrak dapat dianggap positif mengandung flavonoid.

Untuk uji Terpenoid, ekstrak kental dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchard. Kemunculan warna ungu atau merah pada larutan mengindikasikan bahwa ekstrak mengandung terpenoid.

Untuk uji Saponin dilakukan dengan mengambil sejumlah ekstrak kental dan menambahkan 2 mL aquadest. Setelah dikocok kuat dan ditambahkan HCl, keberadaan saponin dapat terindikasikan oleh kehadiran busa yang stabil setelah dikocok.

Untuk uji Tanin melibatkan penambahan ekstrak kental ke dalam tabung reaksi, diikuti dengan beberapa tetes larutan $FeCl_3$ 1%. Jika larutan menunjukkan warna coklat kehitaman, ekstrak dapat dianggap positif mengandung tanin.

b. Penetapan Total Polifenol

Pada Penetapan total polifenol dan penetapan total flavonoid dilakukan dengan metode menurut (Depkes RI, 2017):

Timbang 10 mg asam galat sebagai larutan standar dan dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml. Ditambahkan 1 ml metanol, aduk hingga larut. Kemudian ditambahkan aquadest hingga tanda dan homogenkan. Dibuat deret standar (0,5, 1, 2, 4, 8, dan 16) $\mu\text{g/ml}$ dalam labu ukur 10 ml. Ditambahkan pereaksi Folin 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. Diinkubasi selama 2 jam dan terlindung dari cahaya. Ukur absorban standar pada panjang gelombang larutan induk (754 nm). Pada larutan uji timbang 0,1 g ekstrak dan dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml. Tambahkan aquadest 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 754,15 nm.

c. Penetapan Total Flavonoid

Timbang 0,1 g ekstrak dan masukkan ke dalam mikrotube. Tambahkan 1 ml metanol dan homogenkan dengan vortex hingga merata. Saring larutan ke dalam labu ukur 10 ml, lalu tambahkan etanol hingga mencapai tanda. Buat larutan pembanding dengan menimbang 5 mg kuersetin, masukkan ke dalam mikrotube, dan tambahkan 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 750 μl aluminium klorida 2% ke masing-masing wadah. Kocok larutan dan inkubasikan selama 1 jam dalam kondisi gelap. Ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum. Buat kurva kalibrasi berdasarkan serapan larutan pembanding. Hitung kadar larutan uji berdasarkan kurva kalibrasi yang telah dibuat.