

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### Survey Pendahuluan

Langkah awal dalam penelitian ini adalah survey lapangan untuk mengetahui penyebaran populasi *Rafflesia*. Hasil survey tersebut ditemukan dua populasi *Rafflesia* yaitu di wilayah Aek Telap dan Mandi Urau Kacik.

#### Pengambilan Sampel

Sampel yang diambil dari pohon inang *Rafflesia (Tetrastigma)* adalah akar dan batang. Sedangkan pada *Rafflesia* diambil brakteanya sehingga tidak akan mengganggu pertumbuhannya. Dengan demikian keseluruhan sampel yang diambil sebanyak enam sampel (masing-masing 3 sampel untuk setiap populasi). Selanjutnya sampel tersebut dianalisis kandungan flavonoidnya.

#### Analisis Kandungan Flavonoid

Analisis kandungan flavonoid menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) mengikuti metode yang dijelaskan Nysschen *et al.* (1998).

Ekstraksi dilakukan dengan menghaluskan 4 g sampel menggunakan blender. Sampel yang sudah halus ditambah dengan 62.5% methanol aqueous lalu direfluks selama 2 jam pada suhu 90°C dan selanjutnya didinginkan. Setelah dingin, disaring menggunakan Buchner filter kemudian ditambah larutan methanol hingga volumenya mencapai 50 ml. Larutan diuapkan atau dikeringkan lalu diencerkan dengan 10 ml methanol. Selanjutnya disaring menggunakan kertas saring Whatman 0.45 µm dan diinjeksikan ke HPLC (volume injeksi 2 µl). Kondisi HPLC sebagai berikut :

Kolom	:	Nova-Pak C18 (3.9 x 150 mm, 4 µm)
Kolom	:	Nova-Pak C18 (3.9 x 150 mm, 4 µm)
Fase bergerak	:	Metanol/air (50:50 v/v, pH 2.5 dengan asam trifluoroasetat)
Laju aliran	:	1 ml/menit
Detektor	:	UV 280 nm