

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Dalam penelitian ini dilakukan uji eksperimental secara kualitatif dan kuantitatif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar total senyawa flavonoid dan tanin dalam ekstrak etanol 70% daun kayu bulan serta ekstrak metanol daun kayu bulan.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biofarmakologi Farmasi Program Studi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta dan dilaksanakan dari bulan Maret hingga Agustus 2023.

C. Sampel Penelitian

Pada penelitian ini digunakan sampel daun kayu bulan (*Pisonia alba* Span.) yang diambil dari Desa Nyemangan RT 04, Kelurahan Tirtonirmolo, Kecamatan Kasihan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Daun kayu bulan yang dipakai berwarna hijau cerah.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pelarut etanol 70% dan metanol.

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai Rf, kadar total flavonoid, dan kadar total tanin.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah kecepatan pengadukan, waktu maserasi, dan suhu penguapan ekstrak.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol daun kayu bulan dan ekstrak metanol daun kayu bulan adalah ekstrak yang didapat dari maserasi serbuk daun kayu bulan dengan pelarut etanol 70% dan metanol.

2. Analisis kualitatif dari senyawa flavonoid dan tanin menggunakan KLT dan dibaca nilai Rf.
3. Flavonoid total dinyatakan sebagai mg QE (*Quersetin Equivalent*) dalam satu gram.
4. Tanin total dinyatakan sebagai mg TAE (*Tanin Acid Equivalent*) dalam satu gram.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a) Alat yang digunakan pada proses pembuatan ekstrak etanol daun kayu bulan dan ekstrak metanol daun kayu bulan yaitu oven listrik (Memmert) , grinder, timbangan analitik (Ohaus SW version 10S), tempat maserasi (botol kaca transparan), *hot plate*, sendok kayu, dan gelas ukur.
 - b) Alat yang digunakan pada proses KLT yaitu chamber KLT, dan lampu UV.
 - c) Alat yang digunakan pada proses penentuan kadar total flavonoid dan tanin yaitu alat gelas, timbangan analitik (Ohaus SW version 10S), mikro pipet, spatula, *hot plate*, dan spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer).
2. Bahan
 - a) Proses pembuatan ekstrak daun kayu bulan menggunakan bahan yaitu daun kayu bulan, kain filter, etanol 70%, dan metanol.
 - b) Pengujian kromatografi lapis tipis atau KLT menggunakan bahan yaitu larutan fase gerak, silika gel GF254, *blue tip*, dan pereaksi FeCl₃
 - c) Proses penentuan kadar total flavonoid menggunakan bahan yaitu ekstrak etanol daun kayu bulan, ekstrak metanol daun kayu bulan, kuersetin (Sigma), etanol p.a, AlCl₃, asam asetat 5%, akuades, *blue tip*, dan kertas label.
 - d) Proses penentuan kadar total tanin menggunakan bahan yaitu ekstrak etanol daun kayu bulan, ekstrak metanol daun kayu bulan, pereaksi Folin Ciocalteu (Merck), Na₂CO₃ (Natrium Karbonat), asam tanat (Merck), pipet tetes, kertas saring, dan kertas label.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi daun kayu bulan (*Pisonia alba* Span.) dilaksanakan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Preparasi sampel

Sampel daun kayu bulan yang didapat dicuci hingga bersih lalu diperkecil ukurannya dengan dirajang menjadi bagian-bagian kecil. Selanjutnya sampel dikeringkan dengan oven yang diatur suhunya 40°C. Setelah kering sampel dihaluskan menggunakan grinder hingga menjadi serbuk, kemudian diayak dengan ukuran mesh 40 hingga diperoleh serbuk halus (Prasetyo dkk., 2021).

3. Organoleptis simplisia

Menggunakan indera untuk mendiskripsikan bentuk, warna, bau dan rasa.

4. Ekstraksi sampel

Ekstraksi daun kayu bulan dilakukan menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:10 dalam dua pelarut yang berbeda yaitu etanol 70% dan metanol. Sampel serbuk daun kayu bulan ditimbang 250 gram dimasukkan dalam bejana maserasi ditambahkan 2500 mL pelarut etanol 70% dan 2500 mL pelarut metanol untuk merendam sampel. Larutan diaduk selama 15 menit kemudian wadah maserasi ditutup sampai rapat dan disimpan pada tempat gelap dan terhindar dari sinar matahari langsung. Maserasi dilakukan selama tiga hari dan diaduk 3x24 jam untuk meningkatkan efektifitas difusi senyawa untuk terlarut ke dalam cairan penyari. Setelah perendaman selama 3 hari dilakukan penyaringan dan menghasilkan maserat pertama. Maserat tersebut kemudian diremaserasi hingga filtrat tidak berwarna pekat lagi. Filtrat yang diperoleh digabungkan lalu diuapkan dalam penangas air dengan suhu terkontrol 45°C untuk diperoleh ekstrak etanol dan ekstrak metanol kental dari daun kayu bulan dan dilakukan perhitungan % rendemen dapat dilihat pada persamaan (3) (Mukhriani dkk., 2019).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{bobot simplisia awal (gram)}} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

5. Uji kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengidentifikasi flavonoid dan tanin

a) Pembuatan fase gerak dan penentuan bejana

Fase gerak yang digunakan adalah etanol: etil asetat (9:1) untuk penentuan tanin dan etanol: etil asetat: kloroform (1,5: 2: 8,5) untuk penentuan flavonoid. Selanjutnya dimasukkan ke dalam chamber dan ditutup rapat serta dilakukan penentuan yang ditandai kertas saring sudah terbasahi hingga atas chamber (Yuda & Cahyaningsih, 2017).

b) Pembuatan larutan ekstrak dan pembanding

Ekstrak etanol daun kayu bulan dan ekstrak metanol daun kayu bulan dibuat dengan konsentrasi 40.000 ppm. Lalu larutan standar kuersetin dibuat konsentrasi 1000 ppm dan untuk standar asam tanat 20.000 ppm (Ipandi dkk., 2016).

c) Uji KLT untuk identifikasi kandungan senyawa aktif

Fase diam disiapkan dengan lebar 4 cm dan tinggi 10 cm yang berupa plat KLT silika gel GF254 diberi garis atas bawah 1 cm, garis bawah ditandai setiap 1 cm. Selanjutnya plat dimasukkan ke dalam chamber yang sudah jenuh dan chamber ditutup, lalu diamati sampai eluen naik hingga batas atas. Plat diambil kemudian dikeringkan dan diamati dibawah sinar UV 254 dan 366 nm (Ramlah dkk., 2019).

6. Penentuan kadar total flavonoid

a) Pembuatan larutan standar kuersetin

Dilartukan 10 mg kuersetin dalam etanol p.a sampai volume 10 mL di labu takar dan didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Larutan stok 1000 ppm dibuat seri kadar 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm dengan volume 5 mL dengan etanol p.a (Mukhrani dkk., 2019).

b) Pembuatan larutan $AlCl_3$ 2%

Serbuk $AlCl_3$ ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dengan akuades sampai 50 mL (Ipandi dkk., 2016).

c) Pembuatan larutan asam asetat 5%

Diambil asam asetat glasial dengan jumlah 5 mL kemudian dilarutkan dengan akuades sampai 100 mL (Ipandi dkk., 2016).

d) Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Larutan kuersetin dengan konsentrasi 80 ppm diambil 1000 μL dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 1000 μL AlCl_3 2% dan asam asetat 5% sebanyak 8 mL. Kemudian digojog sampai homogen, dan dilanjutkan pembacaan absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada rentang 350-550 nm (Ipandi dkk., 2016).

e) Penentuan *operating time*

Larutan kuersetin konsentrasi 80 ppm diambil 1000 μL dimasukkan ke tabung reaksi lalu ditambahkan 1000 μL AlCl_3 dan asam asetat 5% sebanyak 8 mL, kemudian digojog sampai homogen. Pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari interval waktu 1 menit sampai didapatkan absorbansi yang stabil (Ipandi dkk., 2016).

f) Pembuatan kurva standar kuersetin

Setiap seri kadar larutan kuersetin diambil 1000 μL dimasukkan ke tabung reaksi lalu ditambahkan 1000 μL AlCl_3 dan asam asetat 5% sebanyak 8 mL, kemudian digojog sampai homogen dan diamkan selama *operating time*. Untuk pembacaan absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum, lalu dilakukan pembuatan kurva hubungan antara kadar kuersetin (ppm) dengan absorbansi (Ipandi dkk., 2016).

g) Pembuatan larutan uji

Ditimbang 100 mg ekstrak etanol dan 100 mg ekstrak metanol, lalu dilarutkan menggunakan etanol p.a sampai 10 mL dan diultrasonik hingga larut sehingga konsentrasi menjadi 10.000 ppm (Lindawati & Ma'ruf, 2020).

h) Pengujian kadar total flavonoid

Diambil 1000 μL ekstrak etanol dan 1000 μL ekstrak metanol, ditambahkan 1000 μL AlCl_3 2% dan asam asetat 5% sebanyak 8 mL dan diinkubasi selama *operating time* pada suhu ruang. Setelah itu dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang

gelombang maksimum, pengujian dilakukan sebanyak 3 kali (Supriatna dkk., 2019).

7. Penentuan kadar total tanin

a) Pembuatan larutan standar asam tanat

Dilartukan 10 mg asam tanat dengan aquadest sampai volume 10 mL di labu takar dan didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Larutan stok dibuat seri kadar 40, 60, 80, 100, 120, 140, dan 160 ppm dengan volume 5 mL dengan aquadest (Pratama dkk., 2019).

b) Pembuatan larutan natrium karbonat 35%

Ditimbang sebanyak 35 gram natrium karbonat (Na_2CO_3) kemudian ditambah aquadest dalam gelas beker dan dipanaskan dengan suhu 60°C hingga natrium karbonat larut semua. Lalu ditambahkan aquadest hingga 100 mL (Chandran & Indira, 2016).

c) Penentuan panjang gelombang maksimum asam tanat

Akuades dimasukkan tabung reaksi sebanyak 4 mL dan larutan asam tanat 50 ppm diambil 250 μL di tabung reaksi lalu ditambahkan 250 μL reagen Folin Ciocalteu dan Na_2CO_3 jenuh sebesar 500 μL . Kemudian digojog sampai homogen, selanjutnya dilakukan pembacaan absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada rentang 400-800 nm (Mukhriani dkk., 2014).

d) Penentuan *operating time*

Akuades dimasukkan tabung reaksi sebanyak 4 mL dan larutan asam tanat 50 ppm diambil 250 μL di tabung reaksi lalu ditambahkan 250 μL reagen Folin Ciocalteu dan Na_2CO_3 jenuh sebesar 500 μL , kemudian digojog sampai homogen. Absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum yang didapat dengan frekuensi waktu 1 menit sampai didapatkan absorbansi yang stabil (Ipandi dkk., 2016).

e) Pembuatan kurva standar asam tanat

Setiap seri kadar larutan asam tanat diambil 250 μL dimasukkan ke tabung reaksi lalu ditambahkan akuades 4 mL dan reagen Folin Ciocalteu

sebesar 250 μL dan Na_2CO_3 jenuh sebesar 500 μL , kemudian digojog sampai homogen dan diamkan selama *operating time*. Pembacaan absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum, lalu dilakukan pembuatan kurva hubungan antara kadar asam tanat (ppm) dengan absorbansi.

f) Pembuatan larutan uji

Ditimbang 200 mg ekstrak etanol dan 200 mg ekstrak metanol, lalu dilarutkan menggunakan etanol p.a sampai 10 mL dan didapatkan konsentrasi 20.000 ppm (Lindawati & Ma'ruf, 2020).

g) Pengujian kadar total tanin

Diambil 250 μL ekstrak etanol dan 250 μL ekstrak metanol kedalam tabung reaksi dan ditambahkan akuades 4 mL lalu ditambahkan 250 μL reagen Folin Ciocalteu dan larutan natrium karbonat sebanyak 500 μL , selanjutnya diinkubasi selama *operating time* dengan suhu ruang dan dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum, pengujian dilakukan sebanyak 3 kali (Pratama dkk., 2019).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penentuan Rf hasil KLT

Nilai Rf atau retardation faktor dinyatakan dengan melihat posisi noda pada fase diam setelah dilakukan elusi. Nilai Rf dihitung menggunakan persamaan (4) (Wulandari, 2011).

$$Rf = \frac{\text{Jarak migrasi analit}}{\text{Jarak migrasi eluen}} \dots\dots\dots(4)$$

2. Penentuan kadar total flavonoid dan tanin

Analisis data uji kadar total flavonoid dan tanin ekstrak etanol serta ekstrak metanol daun kayu bulan, dengan menghitung persamaan regresi linear $y = bx + a$ berdasarkan nilai konsentrasi larutan (sumbu y) dan absorbansi (sumbu x). Standar yang digunakan untuk analisis flavonoid adalah standar kuersetin dan tanin menggunakan standar asam tanat. Kadar senyawa flavonoid dihitung

dalam satuan mg QE/gram dan kadar senyawa tanin dihitung dalam satuan mg TAE/gram menggunakan persamaan (5) dan (6).

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{\text{kadar terhitung (mg/mL)} \times \text{volume total (mL)}}{\text{berat sampel (g)}} \dots\dots(5)$$

$$\text{Kadar tanin total} = \frac{\text{kadar terhitung (mg/mL)} \times \text{volume total (mL)}}{\text{berat sampel(g)}} \dots\dots\dots(6)$$

3. Analisis data

Data kadar flavonoid dan kadar tanin yang didapatkan seluruhnya dianalisis secara statistik menggunakan SPSS. Sebelumnya dilakukan uji distribusi data dengan uji *Shapiro-Wilk* karena total sampel kurang dari 50. Uji homogenitas dengan uji *Levene's* untuk memastikan bahwa kelompok yang membentuk sampel bersumber dari populasi yang sama dengan melihat nilai signifikansinya.

Data kadar flavonoid didapat dinyatakan berdistribusi normal tetapi tidak homogen dan data kadar tanin didapat dinyatakan tidak berdistribusi normal tetapi homogen, sehingga dilanjutkan dengan uji non-parametrik yaitu *Mann Whitney* untuk membandingkan apakah kadar flavonoid dan tanin antara ekstrak etanol dan ekstrak metanol berbeda signifikan atau tidak. Jika didapatkan signifikasinya $>0,05$ ($\alpha=5\%$) maka tidak ada perbedaan hasil sampel yang signifikan dari pelarut yang digunakan.