

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian Skripsi

Penelitian ini dilakukan secara kuantitatif menggunakan metode eksperimental di ruang laboratorium. Sampel simplisia daun, batang, dan akar Kirinyuh (*C. odorata* L.) dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Hasil maserasi yang didapatkan yaitu berupa filtrat, lalu diuapkan sampai menjadi ekstrak kental. Selanjutnya, diuji penentuan kadar total fenolik dan flavonoid ekstrak kental tersebut. Penetapan kadar total fenolik menggunakan standar asam galat dan flavonoid menggunakan standar kuersetin dalam pengujiannya. Kemudian, dilanjutkan dengan pengukuran penetapan kadar total fenolik dan flavonoid menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April-Agustus 2022, di Laboratorium Kimia Farmasi Prodi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

C. Populasi dan Sampel

Pada penelitian ini digunakan sampel bagian daun, batang, dan akar Kirinyuh (*C. odorata* L.) yang masih muda. Sampel uji diperoleh dari Kecamatan pajangan, Kabupaten Bantul, Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: kadar larutan sampel (daun, batang, dan akar) Kirinyuh (*C. odorata* L.).
2. Variabel terikat: total kandungan fenolik dan flavonoid sampel (daun, batang, dan akar) Kirinyuh (*C. odorata* L.).
3. Variabel terkontrol: masa pengambilan sampel, penentuan bagian yang akan diambil meliputi (daun, batang, dan akar), pelarut ekstraksi, dan cara melakukan proses ekstraksi.

E. Definisi Operasional

1. Waktu pengumpulan sampel Kirinyuh (*C. odorata* L.) dilakukan pada awal bulan mei dari pagi sampai siang hari.
2. Bagian yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah diambil dari pucuk daun (helaian tingkatan ke-3 sampai tingkatan ke-7 dari pucuk tumbuhan), diambil dari pucuk batang panjangnya sekitar 60-80 cm, dan diambil dari ujung akar panjangnya sekitar 6-8 cm dengan diameter 0,2-0,5 cm.
3. Senyawa standar yang digunakan dalam penetapan kadar total senyawa fenolik dan flavonoid adalah asam galat dan kuersetin.
4. Kadar total fenolik pada penelitian ini merupakan total fenolik yang terkandung pada ekstrak sampel yang telah diukur serapannya pada λ optimum dan dihitung sebagai nilai %b/b EAG (Ekuivalen Asam Galat).
5. Kadar total flavonoid pada penelitian ini merupakan total flavonoid yang terkandung pada ekstrak sampel yang telah diukur serapannya pada λ optimum sebagai nilai %b/b EK (Ekuivalen Kuersetin).
6. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%.
7. Metode ekstraksi yang akan dipakai adalah metode maserasi.
8. Metode pengukuran serapan yang akan digunakan adalah metode spektrofotometri UV-Vis.

F. Alat dan Bahan

1. Bahan: akuades, *aluminium foil*, sampel (daun, batang, akar) Kirinyuh (*C. odorata* L.), etanol 70%, etanol *p.a* (*Merck*), metanol *p.a* (*Merck*), pelarut WFI (*Water For Injection*), larutan HCl 2N (*Mallingckrodt*), larutan HCl pekat (*Mallingckrodt*), serbuk magnesium (*Merck*), larutan CHCl₃ (*Merck*), n-heksan (*Merck*), standar kuersetin (*Sigma-Aldrich*), larutan AlCl₃ 10% (*Merck*), larutan CH₃COOH 5% (*Merck*), larutan Na₂CO₃ 7% (*Merck*), pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, standar asam galat (*Sigma-Aldrich*), reagen Folin-Ciocalteu (*Merck*), pereaksi FeCl₃ 5% dan 1% (*Merck*), kain halus, dan plat silika gel F254 (*Merck*).
2. Alat: bejana KLT, corong plastik, kompor listrik, *hotplate*, timbangan analitik (*Ohaus*), gunting, *herb grinder*, seperangkat alat-alat gelas (*Pyrex* dan *Iwaki*),

rak tabung reaksi (Iwaki), toples kaca, panci, wajan, cawan porselin, pipet tetes, pipet ukur, pinset, piknometer, penggaris, *droplate*, pipet volume, mikropipet skala 100-1000 μL (Ohaus), oven (*Memmert UN 160*), sendok tanduk, sendok kayu, sendok *stainless*, spektrofotometer UV-Vis (*Genesis 10S UV-Vis*), dan *UV Viewing Cabinet* (Lokal UVOC-2), *vortex*, dan vakum *buchner* (Rocker).

G. Prosedur Kerja dan Pengumpulan Data

1. Pengambilan dan Determinasi Tanaman sampel

Sampel daun, batang, dan akar Kirinyuh (*C. odorata L.*) diperoleh dari Dusun Kersan, Desa Triwidadi, Kecamatan Pajangan, Kabupaten Bantul, Yogyakarta pada awal bulan Mei 2022 dengan ketinggian wilayah mencapai ± 100 mdpl (meter di atas permukaan laut). Ciri-ciri tumbuhan Kirinyuh yang akan digunakan adalah daun lebar dengan sisi bergerigi, muda agak ketuaan, mengeluarkan bau khas bila diremas, bentuk batang bercabang, kulit batang berambut, diameter batang berkisar 0,5-1,5 cm, panjangnya sekitar 1 m dari atas pucuk tumbuhan, dan panjang akarnya sekitar 6-8 cm dengan diameter 0,2-0,5 cm. Setelah itu, dilanjutkan dengan determinasi tanaman sampel di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan.

2. Penyiapan sampel

Bagian daun, batang, dan akar Kirinyuh (*C. odorata L.*) yang sudah dikumpulkan masing-masing sebanyak $\pm 1,5$ kg disortasi basah, dibersihkan dengan air mengalir, dirajang, dan dikeringkan. Kemudian, disortasi kering dan dipisahkan sesuai masing-masing bagian. Selanjutnya sampel simplisia dihaluskan dan diayak dengan menggunakan ayakan ukuran 40/60 *mesh* hingga diperoleh simplisia serbuk pada derajat kehalusan tertentu, sebelum dilakukannya proses ekstraksi.

3. Ekstraksi sampel

Serbuk simplisia daun, batang, dan akar Kirinyuh (*C. odorata L.*) dimasukkan ke dalam toples kaca sebesar 250 g, lalu dimaserasi dengan ditambahkan pelarut etanol 70% (1:8) sebanyak 1,2 L, diaduk dan ditutup.

Diaduk kembali setelah 2 jam pertama, lalu dibiarkan selama 24 jam. Didiamkan selama 3 hari dalam suhu kamar dan bebas paparan sinar matahari sambil sesekali diaduk di tiap harinya. Lalu, ekstrak yang terbentuk disaring dan diremas menggunakan kain halus hingga didapatkan residu dan filtratnya. Selanjutnya, residu sampel diremaserasi kembali dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1,2 L dan dibiarkan kembali selama 2 hari sambil sesekali diaduk di tiap harinya. Setelah itu, filtrat hasil maserasi dan remaserasi dikumpulkan dan diuapkan dengan kompor listrik sampai didapatkan ekstrak kental.

4. Kontrol kualitas ekstrak

- a. Perhitungan rendemen: dihitung berdasarkan perbandingan antara berat ekstrak akhir yang diperoleh dengan berat sampel awal yang diekstrak lalu dikalikan 100%.
- b. Uji organoleptik: dilakukan pengamatan sifat karakteristik fisik dari suatu bahan yang diuji seperti bau, rasa, bentuk, dan warna.
- c. Penetapan bobot jenis: ditimbang piknometer kosong, kemudian dimasukkan akuades ke dalam piknometer, ditimbang dan dicatat pada suhu 25°C. Setelah itu, akuades dalam piknometer dikeluarkan dan dikeringkan. Dimasukkan ekstrak sampel masing-masing konsentrasi 5% ke dalam piknometer dan diatur suhunya mencapai 25°C lalu ditimbang. Selanjutnya, dilakukan perhitungan bobot jenis dari hasil penimbangan tersebut.

5. Penapisan kandungan fitokimia

- a. Identifikasi alkaloid: dimasukkan ekstrak sampel 0,2 gram yang sudah dilarutkan etanol 70% untuk masing-masing bagian ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 mL, ditambahkan dengan 3 mL HCl 2N. Dipanaskan, kemudian didinginkan lalu dibagi ke dalam 3 lubang *droplate* masing-masing bagian sebanyak 10 tetes. Tiap *droplate* ditambahkan dengan masing-masing reagen pereaksi 3-4 tetes. Positif alkaloid jika ditetesi reagen Dragendorff muncul warna merah jingga atau endapan coklat jingga, Mayer muncul endapan putih kekuningan atau kekeruhan, dan Wagner muncul endapan kecoklatan (Muthmainnah, 2017).

- b. Identifikasi fenolik: dimasukkan ekstrak sampel 5% untuk masing-masing bagian ke dalam *droplate* sebanyak 10 tetes. Setelah itu, ditambahkan 5-6 tetes larutan FeCl_3 5%. Warna biru, biru kehitaman, hijau, hijau kehitaman, ungu atau kemerahan-merahan menandakan hasil positif pada pengujian fenolik (Oktavia & Sutoyo, 2021).
 - c. Identifikasi flavonoid: dimasukkan ekstrak sampel 5% untuk masing-masing bagian ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan magnesium secukupnya dan 3 tetes HCl pekat, lalu digojog hingga larut. Selanjutnya dipanaskan di atas *waterbath* selama 10-15 menit. Timbulnya warna kuning, biru, jingga maupun merah menunjukkan hasil positif flavonoid (Muthmainnah, 2017; Oktavia & Sutoyo, 2021).
 - d. Identifikasi saponin: dimasukkan ekstrak sampel 5% untuk masing-masing bagian ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 mL ditambahkan 3 mL akuades panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Bila muncul buih stabil sekitar 1-2 cm ditambahkan 1-2 tetes HCl 2N dan dibiarkan selama \pm 10 menit. Buih tidak hilang berarti menunjukkan adanya kandungan saponin (Muthmainnah, 2017).
 - e. Identifikasi tanin: dimasukkan ekstrak sampel 5% untuk masing-masing bagian ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 mL ditambahkan 3 mL akuades panas. Kemudian, dididihkan selama 5 menit dan filtratnya ditambahkan FeCl_3 1% 3-4 tetes. Positif tanin katekol bila muncul warna hijau kehitaman dan positif tanin pirogalol/galat bila muncul warna biru kehitaman (Muthmainnah, 2017).
6. Penentuan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Disiapkan sampel konsentrasi 4% dan pembanding standar kuersetin konsentrasi 0,1% yang sudah ditambahkan dengan pelarut metanol *p.a.* Kemudian, ditotolkan beberapa tetes secara vertikal pada plat silika gel F254 yang berukuran 10 cm x 4 cm. Lalu, dijenuhkan dalam suatu bejana yang berisikan fase gerak dengan perbandingan yaitu metanol, kloroform, dan n-heksan (1 : 9 : 1 v/v). Hasil plat yang telah terelusi, diamati dibawah sinar

visibel, ultraviolet 254 nm dan ultraviolet 365 nm. Noda tidak kelihatan, maka disemprotkan dengan penampak bercak AlCl_3 1%.

7. Penetapan kadar total fenolik

Penetapan kadar total fenolik ekstrak etanol Kirinyuh, mengacu pada panduan Chun *et al.*, (2003); Ahmad *et al.*, (2015); Malik dan Ahmad (2015) dengan menggunakan asam galat sebagai baku pembanding dan reagen Folin-Ciocalteu yang sudah dimodifikasi.

a. Pembuatan larutan baku induk asam galat

Ditimbang sebesar 20 mg asam galat dan dilarutkan metanol *p.a* ke dalam labu ukur sebatas 10 mL untuk larutan 2000 ppm. Diambil 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL dan 2,5 mL larutan baku 2000 ppm untuk membuat (100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm). Setelah itu, dilarutkan metanol *p.a* ke dalam labu ukur sebatas 10 mL.

b. Penetapan λ optimum asam galat

Dimasukkan 0,1 mL larutan baku 500 ppm ke dalam labu ukur 5 mL. Dilarutkan 0,1 mL reagen Folin-Ciocalteu, kemudian digojog \pm 1-2 menit dan didiamkan 4-8 menit pada suhu kamar, lalu dilarutkan 1 mL Na_2CO_3 7%. Setelah itu, ditambahkan *Water For Injection* sebatas 5 mL. Dilakukan *scanning* λ optimum sinar tampak 600 nm-800 nm.

c. Penentuan *operating time* (OT)

Dimasukkan 0,1 mL larutan baku 500 ppm ke dalam labu ukur 5 mL. Dilarutkan 0,1 mL reagen Folin-Ciocalteu, kemudian digojog \pm 1-2 menit dan didiamkan 4-8 menit pada suhu kamar, lalu dilarutkan 1 mL Na_2CO_3 7%. Setelah itu, ditambahkan *Water For Injection* sebatas 5 mL. Diukur serapan dengan nilai λ maksimum disetiap 1 menit (738 nm) dan dilihat masa *operating time* larutan untuk menghasilkan serapan yang konstan.

d. Pembuatan kurva baku asam galat

Diambil masing-masing seri konsentrasi 0,1 mL dari larutan (100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm) untuk membuat seri konsentrasi (2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm). Kemudian, dilarutkan 0,1 mL larutan Folin-Ciocalteu, digojog \pm 1-2 menit lalu didiamkan 4-8 menit pada

suhu kamar. Setelah itu, dilarutkan 1 mL Na_2CO_3 7%, ditambahkan *Water For Injection* ke dalam labu ukur sebatas 5 mL dan diinkubasi selama *operating time* (1 jam 35 menit). Diukur serapan pada λ optimum dan diperoleh hasil kurva kalibrasi larutan baku dengan persamaan garis linear $y = bx + a$.

e. Penetapan kadar total fenolik sampel Kirinyuh

Ditimbang 5 mg ekstrak etanol daun, batang, dan akar Kirinyuh. Dilarutkan metanol *p.a* sebatas 10 mL. Diambil 0,1 mL larutan, kemudian dilarutkan 0,1 mL larutan Folin-Ciocalteu, digojog \pm 1-2 menit lalu dibiarkan 4-8 menit pada suhu kamar. Setelah itu, dilarutkan 1 mL Na_2CO_3 7% dan ditambahkan *Water For Injection* ke dalam labu ukur sebatas 5 mL. Diinkubasi selama *operating time* (1 jam 35 menit) dan diukur serapannya pada λ optimum (738 nm). Pengukuran dilakukan dengan cara 3 kali pengulangan dengan konsentrasi fenolik dihitung dari substitusi pada persamaan regresi linier dan dinyatakan sebagai kadar total fenolik ekstrak dalam mg EAG/g ekstrak atau %b/b.

8. Penetapan kadar total flavonoid

Penetapan kadar total flavonoid ekstrak etanol Kirinyuh, mengacu pada panduan Chang *et al.*, (2002); Ahmad *et al.*, (2014); dan Ahmad *et al.*, (2015) dengan menggunakan kuersetin sebagai baku pembanding dan reagen AlCl_3 yang sudah dimodifikasi.

a. Pembuatan larutan baku induk kuersetin

Ditimbang sebesar 10 mg kuersetin dan dilarutkan etanol *p.a* ke dalam labu ukur sebatas 10 mL untuk larutan 1000 ppm. Diambil dari larutan 1000 ppm sebanyak masing-masing 0,4 mL, 0,6 mL, 0,8 mL, 1 mL, dan 1,2 mL. Setelah itu, ditambahkan larutan etanol *p.a* ke dalam labu ukur sebatas 10 mL untuk membuat seri konsentrasi (40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm dan 120 ppm).

b. Penetapan λ optimum kuersetin

Dimasukkan 1 mL larutan baku 100 ppm ke dalam tabung reaksi. lalu, dilarutkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL CH_3COOH 5%. Kemudian, dilakukan *scanning* λ optimum pada rentang 350 nm-450 nm.

c. Penentuan *operating time* (OT)

Dimasukkan 1 ml larutan baku 100 ppm ke dalam tabung reaksi. lalu, dilarutkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL CH_3COOH 5%. Diukur serapan dengan nilai λ maksimum sebelumnya (415 nm) disetiap 2 menit dan dilihat masa *operating time* larutan untuk menghasilkan serapan yang konstan.

d. Pembuatan kurva baku kuersetin

Diambil larutan standar kuersetin 1 mL dari masing-masing seri konsentrasi (40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm dan 120 ppm). Setelah itu, dilarutkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL CH_3COOH 5%, lalu diinkubasi selama *operating time* (30 menit). Diukur serapan pada λ optimum (415 nm) dan diperoleh hasil kurva kalibrasi larutan baku dengan persamaan garis linear $y = bx + a$.

e. Penetapan kadar total flavonoid sampel

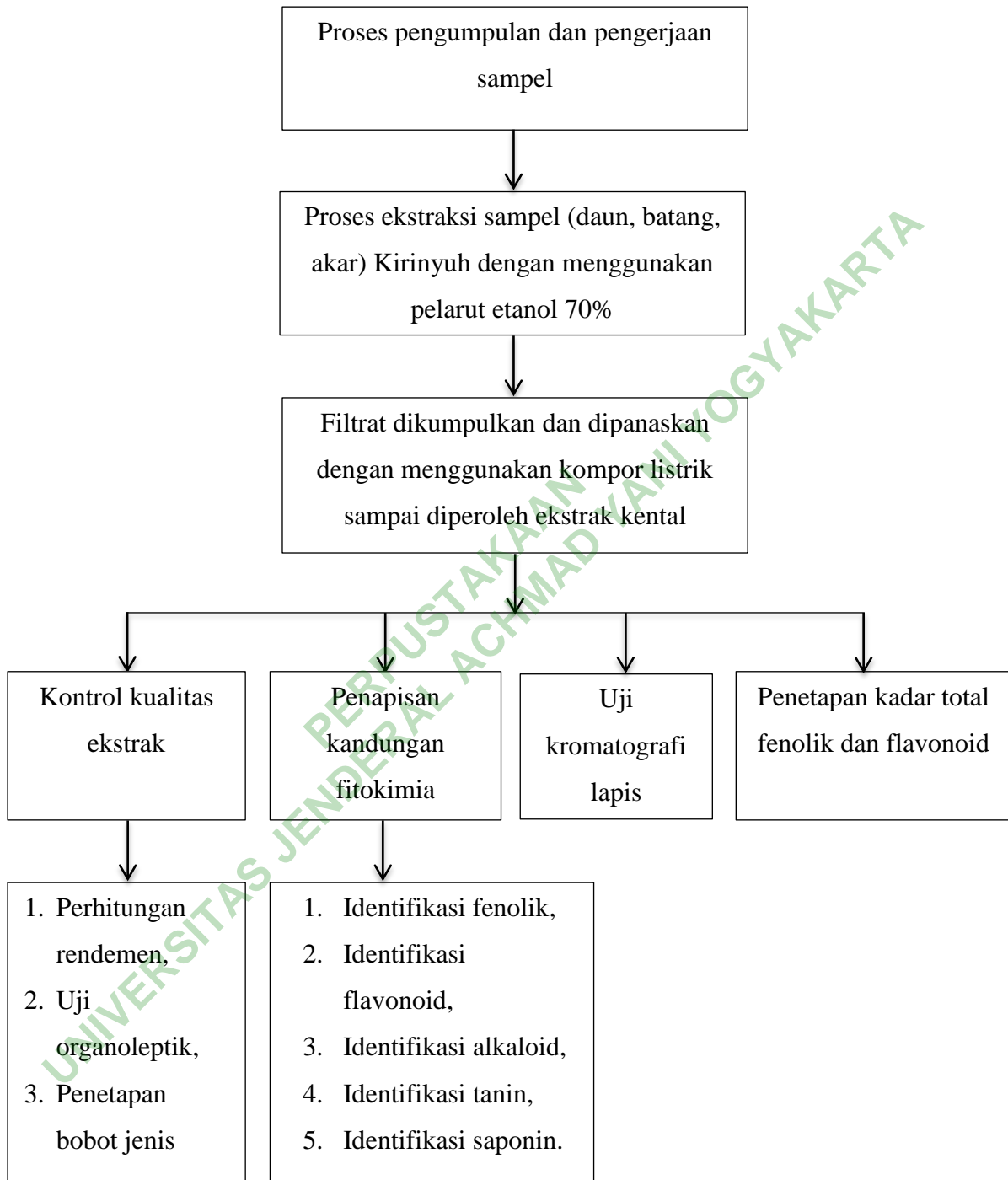
Ditimbang 30 mg ekstrak etanol daun, batang, dan akar Kirinyuh, dilarutkan etanol *p.a* sebatas 10 mL. Diambil 1 mL larutan tersebut, kemudian ditambahkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL CH_3COOH 5% ke dalam tabung reaksi. Diinkubasi selama *operating time* (30 menit) dan diukur serapannya pada λ optimum (415 nm). Pengukuran dilakukan 3 kali pengulangan dengan konsentrasi flavonoid dihitung dari substitusi pada persamaan regresi linier dan dinyatakan sebagai kadar total flavonoid ekstrak dalam mg EK/g ekstrak atau %b/b.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Data yang didapatkan adalah data primer, didapatkan pada hasil pengukuran analisis nilai serapan larutan baku pembanding masing-masing yakni fenolik (asam galat) dan flavonoid (kuersetin). Dirancang dalam bentuk kurva baku kalibrasi dan persamaan regresi liniernya antara konsentrasi (x) vs absorbansi (y) dengan menggunakan aplikasi *microsoft excel*.

Untuk dapat mengetahui nilai kadar total yang terdapat pada ekstrak etanol daun, batang, dan akar Kirinyuh. Dimasukkan nilai pengukuran serapan (absorbansi) sampel kedalam perhitungan persamaan regresi linier larutan baku standar yaitu $y = bx + a$, dimana sampel absorbansi (y) dan konsentrasi (x). Kemudian dijumlahkan dan didapatkan hasil kadar total fenolik dan flavonoid yang dinyatakan sebagai nilai %b/b EAG dan sebagai nilai %b/b EK. Setelah itu, hasil nilai %b/b kadar total tersebut dianalisis statistik menggunakan uji parametrik *Repeated Measures* ANOVA pada masing-masing bagian tumbuhan.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA
PERPUSTAKAAN

Bagan Alur Penelitian**Gambar 1. Bagan Alur Penelitian**