

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian kuantitatif dengan metode yang bersifat eksperimental laboratorium. Daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea*) diekstraksi dengan teknik maserasi menggunakan etanol teknis 70%. Hasil ekstraksi berupa filtrat kemudian dipekatkan hingga diperoleh ekstrak kental. Selanjutnya ekstrak kental yang diperoleh digunakan untuk uji penentuan total senyawa flavonoid dan total fenolik. Penetapan kadar total fenolik menggunakan asam galat sebagai standar dan kuersetin standar digunakan dalam penetapan kadar total flavonoid. Penetapan kadar total flavonoid dan total fenolik dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian: Laboratorium Kimia Prodi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.
2. Waktu penelitian: April-Juni 2021.

C. Populasi dan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea*) yang masih muda (urutan ke-2 sampai 4 dari pucuk tanaman), yang diperoleh dari Kecamatan Playen Gunung Kidul Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: kadar senyawa standar.
2. Variabel terikat: kadar total senyawa flavonoid dan fenolik.
3. Variabel terkontrol: waktu pengambilan sampel, pemilihan daun, suhu, pelarut ekstraksi dan metode ekstraksi.

E. Definisi Operasional

1. “Senyawa standar yang digunakan untuk penentuan kadar total flavonoid adalah kuersetin dan senyawa standar yang digunakan untuk penentuan kadar total fenolik adalah asam galat”.
2. “Kadar flavonoid total dalam penelitian ini adalah jumlah kandungan total flavonoid yang terdapat dalam ekstrak yang diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (nm)”.
3. “Kadar fenolik total dalam penelitian ini adalah jumlah kandungan total senyawa fenolik yang terdapat dalam ekstrak yang diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (nm)”.
4. “Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 70%”.
5. “Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian adalah maserasi”.

F. Alat dan Bahan

1. Alat: alat-alat gelas, alat maserasi, blender, cawan porselin, corong buchner, mikropipet, *moisture content balance*, neraca analitik, pH meter, pipet ukur (*pyrex*), pipet tetes, plat tetes, spektrofotometri UV-Vis.
2. Bahan: akuades, AlCl_3 , aluminium foil, asam asetat, asam klorida pekat, asam format, aseton, etanol 70% (teknis), etil asetat, FeCl_3 , kain, kloroform, metanol (*p.a*), natrium karbonat 7%, reagen folin-ciocalteu, plat silika gel F254, pereaksi wagner, pereaksi mayer, pereaksi dragendorff, simplisia daun kupu-kupu, standar asam galat, standar kuersetin, toluena.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan Bahan dan Determinasi Tanaman

Daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) dipanen dari Desa Ngawu, Kecamatan Playen, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta dan daun yang diambil adalah daun yang masih muda (urutan ke-2 sampai 4 dari pucuk tanaman *Bauhinia purpurea* L). Selanjutnya dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Penyiapan sampel

Sampel daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L) yang telah diperoleh disortasi basa dan dibersihkan dari kotoran yang menempel, lalu dicuci bersih dengan air mengalir lalu dipotong-potong. Selanjutnya daun kupu-kupu tersebut dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Simplisia daun kupu-kupu kemudian dihaluskan dengan blender hingga berbentuk serbuk dan ditimbang berat serbuk sebanyak 300 gram dan siap untuk diekstraksi.

3. Ekstraksi sampel

Sampel daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea*) 300 gram dimasukkan ke dalam bejana maserasi, kemudian ditambahkan dengan etanol 70% dengan perbandingan 1:10 hingga terendam semua bagian sampel. Wadah maserasi ditutup rapat dan didiamkan selama 3 hari sambil sesekali diaduk dan disimpan ditempat yang gelap/terhindar dari cahaya matahari. Hasil maserasi lalu disaring untuk memisahkan antara ampas dan filtrat. Selanjutnya bagian ampas diremaserasi sebanyak dua kali dengan etanol 70% hingga terendam semua bagian sampel dan didiamkan selama 2 hari dengan sesekali diaduk. Filtrat maserasi dan remaserasi digabung dan dipekatkan dengan cara pemanasan menggunakan kompor listrik hingga diperoleh ekstrak kental.

4. Kontrol kualitas Ekstrak

Setelah diperoleh ekstrak kental, selanjutnya dilakukan penetapan organoleptis, penentuan rendemen ekstrak, penentuan kadar lembab dan bobot jenis.

a. Perhitungan rendemen ekstrak dengan menggunakan persamaan :

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot sampel}} \times 100\%$$

b. Penetapan organoleptik. Dilakukan pengamatan terhadap ekstrak secara fisik dengan menggunakan alat indera secara spesifik meliputi tekstur, bau, warna dan rasa.

c. Penentuan kadar lembab. Ditimbang sebanyak 1 gram ekstrak lalu dimasukkan ke dalam alat *moisture balance*. Ekstrak diratakan kemudian alat dijalankan, selanjutnya akan diperoleh data kadar air yang terkandung di dalam ekstrak daun kupu-kupu tersebut.

d. Bobot jenis. Penentuan bobot jenis dilakukan dengan menggunakan piknometer yang bersih dan kering. Piknometer yang digunakan ditimbang terlebih dahulu kemudian diisi dengan akuades dan diatur pada suhu 25°C serta ditimbang. Selanjutnya akuades dalam piknometer dikeluarkan dan dikeringkan lalu dimasukkan ekstrak sampel cair 5% ke dalam piknometer tersebut, diatur suhunya 25°C dan ditimbang.

5. Penapisan fitokimia

- a. Identifikasi fenolik. Ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan sedikit eter, dikocok homogen. Lapisan eter diambil dan dikeringkan pada plat tetes lalu ditambahkan 2-3 tetes FeCl_3 , adanya senyawa fenol ditandai dengan terbentuk warna hijau kehitaman.
- b. Identifikasi flavonoid. Ekstrak sampel ditambahkan 1-2 mL air panas dan sedikit serbuk magnesium, lalu dikocok hingga tercampur homogen. Ditambahkan 4-5 tetes HCl dan 4-5 tetes etanol lalu dikocok homogen. Apabila timbul warna merah, kuning atau jingga maka positif mengandung flavonoid.
- c. Identifikasi saponin. Ekstrak sampel ditambahkan 0,5 mL air panas dan dikocok secara vertikal. Apabila timbul busa pada larutan, maka ditambahkan HCl 1% dan ditunggu selama 10 menit. Jika busa tidak hilang maka positif mengandung saponin.
- d. Uji tanin. Ekstrak sampel ditambahkan 1-2 mL air dan 2 tetes FeCl_3 1%. Apabila menghasilkan warna biru kehitaman maka positif mengandung tanin.
- e. Uji alkaloid. Ekstrak dilarutkan 2 mL HCl 2% dan dibagi menjadi 3 bagian dalam tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan 3 tetes reagen Mayer, hasil positif jika adanya endapan putih atau kuning. Tabung kedua ditambahkan 3 tetes reagen Wagner, hasil positif jika terbentuk endapan coklat. Tabung ketiga ditambahkan dengan 3 tetes reagen Wagner, hasil positif jika terbentuk endapan jingga.

6. Uji Kromatografi lapis tipis (KLT)

Ekstrak larut etanol daun kupu-kupu dan pembanding kuersetin yang telah dilarutkan dengan etanol 70%, ditotolkan bersama-sama pada lempeng

kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel F254 dan fase gerak berdasarkan hasil optimasi. Bercak kromatogram (noda) yang dihasilkan diamati pada sinar ultraviolet 254 nm dan 366 nm. Bercak dengan fluoresensi warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

7. Penetapan kadar fenolik total ekstrak daun kupu-kupu

Penetapan kadar fenol total dengan metode kolorimetri Folin-Ciocalteu yang mengacu pada prosedur Chun et al., (2003) dalam Malik et al., (2015) dengan menggunakan asam galat sebagai standar.

a. Pembuatan larutan standar asam galat

Ditimbang 10 mg asam galat dilarutkan dengan metanol p.a hingga volume 10 mL sehingga diperoleh 1000 $\mu\text{g/mL}$. Dari larutan stok tersebut dipipet 1, 2, 3, 4, 5 mL dan dicukupkan dengan metanol p.a hingga 5 mL, sehingga dihasilkan konsentrasi 200, 400, 600, 800 dan 1000 $\mu\text{g/mL}$.

b. Penentuan *operating time* (OT)

Diambil 0,1 mL larutan stok standar asam galat lalu ditambah 0,1 mL reagen Folin-Ciocalteu, larutan Na_2CO_3 7% 1 mL dan akuabides hingga 5 mL. Kemudian dibaca serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ maksimum (nm) dengan interval waktu 2 menit hingga diperoleh nilai absorbansi yang stabil.

c. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum (λ maks).

Sebanyak 0,1 mL larutan asam galat 200, 400, 600, 800 dan 1000 $\mu\text{g/mL}$ ditambah dengan 0,1 mL reagen Folin-Ciocalteu. Kemudian dilakukan penambahan 1 mL larutan Na_2CO_3 7% dan akuabides hingga 5 mL dan didiamkan selama OT. Kemudian dilakukan *scanning* panjang gelombang serapan maksimum pada panjang gelombang 600-800 nm.

d. Pembuatan kurva baku standar asam galat

Diambil masing-masing 0,1 mL dari tiap konsentrasi 200, 400, 600, 800 dan 1000 $\mu\text{g/mL}$ lalu ditambahkan 0,1 mL reagen folin-ciocalteu, dikocok dan dibiarkan 4 menit lalu ditambahkan 1 mL larutan Na_2CO_3 7% dan dikocok hingga homogen. Ditambahkan akuabides hingga 5 mL lalu didiamkan

selama 2 jam pada suhu ruangan. Selanjutnya diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimal. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

e. Penetapan kadar total fenolik

Sampel dilarutkan dengan metanol p.a lalu diambil sebanyak 0,1 mL, kemudian ditambahkan dengan 0,1 mL reagen Folin-Ciocalteu dikocok dan dibiarkan 4 menit, lalu ditambah 1 mL larutan Na_2CO_3 7% dan akuabides hingga 5 mL, dikocok hingga homogen. Didiamkan selama waktu *operating time* pada suhu ruangan. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (nm).

8. Penetapan kadar flavonoid total ekstrak daun kupu-kupu

Penetapan kadar flavonoid total dengan menggunakan metode kolorimetri aluminium klorida yang mengacu pada prosedur Chang *et al.*, dalam Ahmad *et al.*, (2015) dan Ahmad *et al.*, (2014) dengan menggunakan kuersetin sebagai standar.

a. Pembuatan larutan standar kuersetin

Pembuatan larutan standar kuersetin dilakukan dengan cara ditimbang 10 mg kuersetin dan dilarutkan dalam etanol 100 mL, sehingga diperoleh larutan stok 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dari larutan stok tersebut dibuat konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimum (nm).

b. Penentuan *operating time* (OT)

Diambil larutan stok kuersetin sebanyak 1 mL lalu ditambahkan AlCl_3 10% 1 mL dan asam asetat 5% 8 mL. Kemudian diukur absorbansinya pada λ maksimum (nm) dengan interval pada waktu 2 menit hingga diperoleh nilai absorbansi yang stabil.

c. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ maks)

Diambil larutan stok kuersetin sebanyak 1 mL lalu ditambahkan AlCl_3 10% 1 mL dan asam asetat 5% 8 mL. Lakukan pembacaan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 350-450 nm.

d. Pembuatan kurva baku standar kuersetin

Diambil masing-masing 1 mL larutan standar kuersetin dari tiap konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 $\mu\text{g/mL}$ lalu ditambahkan sebanyak 1 mL AlCl_3 10% dan asam asetat 5% 8 mL. Selanjutnya diinkubasi selama waktu *operating time*, lalu absorbansi kuersetin diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ maksimum (nm). Masing-masing konsentrasi kuersetin diukur sebanyak tiga kali.

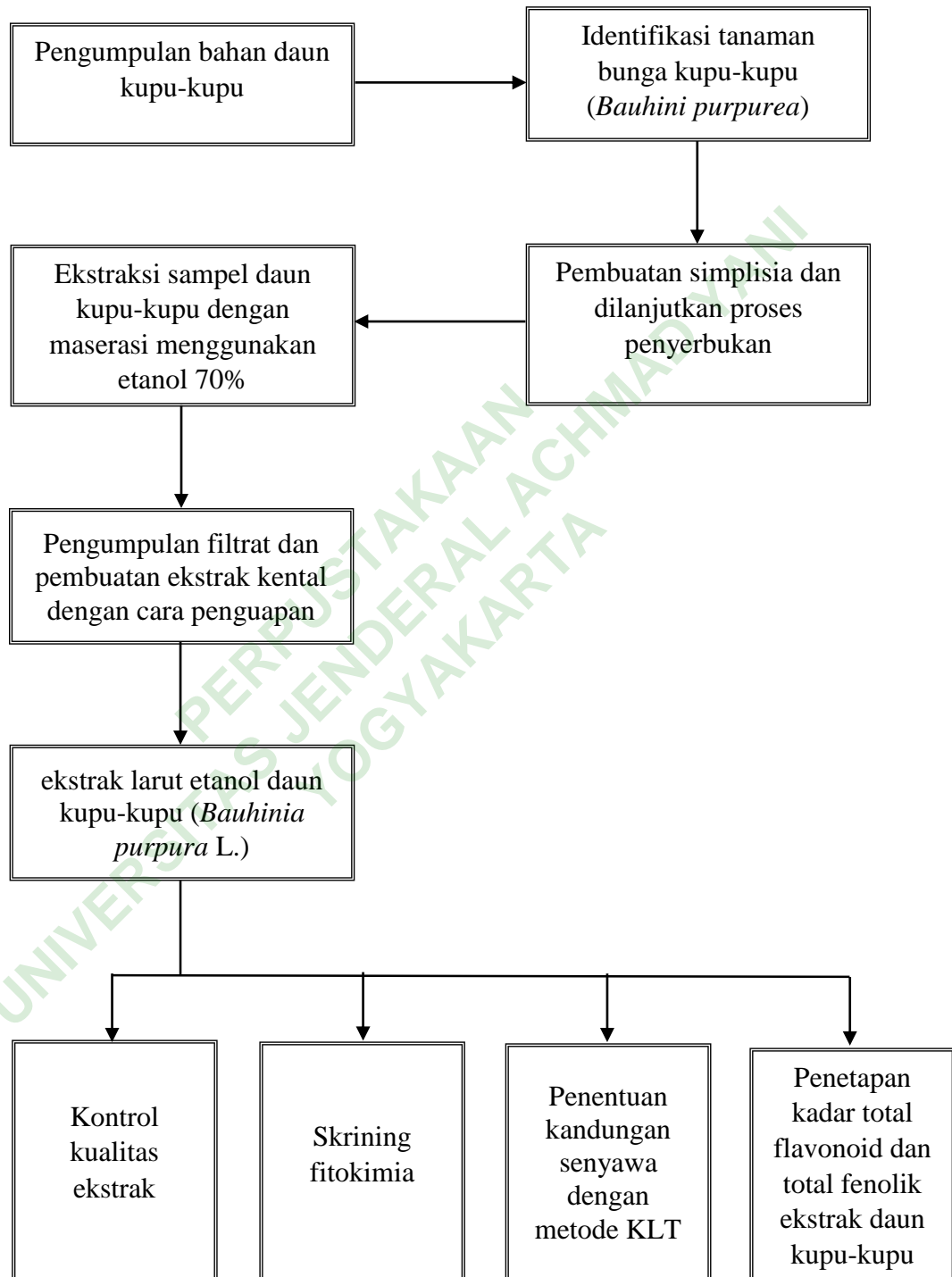
e. Penetapan kadar total flavonoid

Sampel ekstrak dilarutkan dengan etanol p.a lalu diambil sebanyak 1 mL larutan ekstrak dan ditambahkan dengan AlCl_3 10% 1 mL dan 8 mL asam asetat 5%. Dilakukan inkubasi selama waktu *operating time*, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal (nm) sebanyak empat replikasi.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Data yang dikumpulkan merupakan data primer, yang diperoleh dari nilai absorbansi pada masing-masing larutan pembanding asam galat dan kuersetin dibuat dengan kurva kalibrasi dan diperoleh persamaan regresi linier.

Analisis data kadar total senyawa dihitung dengan memasukkan ke dalam persamaan regresi linier $y = bx + a$, yang diperoleh dari kurva kalibrasi masing-masing larutan pembanding, dimana y adalah absorbansi dan x adalah konsentrasi/kadar senyawa. Persamaan regresi linear dihitung dengan menggunakan program Microsoft Excel sehingga diperoleh persamaan linier standar dari kurva absorbansi (y) vs konsentrasi (x). Konsentrasi senyawa fenolik dan flavonoid dari larutan sampel dihitung berdasarkan persamaan linier dari standar (pembanding).

Bagan Alur Penelitian**Gambar 10. Bagan alur penelitian**