

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental yang menghasilkan data kualitatif dan kuantitatif yang bertujuan untuk mengetahui bagaimana variabel bebas mempengaruhi variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini ialah metode ekstraksi, sedangkan variabel terikat pada penelitian ini kadar flavonoid total daun sukun. Pada penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi dan UAE untuk mendapatkan ekstrak daun sukun. Kedua ekstrak yang diperoleh di uji kadar flavonoid totalnya menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Kadar flavonoid total dari masing-masing ekstrak daun sukun dibandingkan untuk menentukan metode mana yang paling baik dalam menghasilkan flavonoid.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Mei 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun sukun diambil dari Desa Panggungharjo, Kecamatan Sewon, Kabupaten Bantul, Yogyakarta.

2. Sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara acak (*random sampling*), dipilih daun sukun yang masih segar, hijau dan tidak terlalu tua yaitu 3-5 dari tangkai dahan dipanen pada pagi hari.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini ialah perbedaan metode ekstraksi daun sukun.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini ialah kadar flavonoid total ekstrak daun sukun.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini ialah suhu pengeringan, waktu panen, kondisi sampel, waktu ekstraksi maserasi dan UAE, pelarut ekstraksi maserasi dan UAE, waktu dan suhu inkubasi sampel.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak Daun Sukun

Ekstrak daun sukun merupakan ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi simplisia daun sukun menggunakan metode maserasi dan UAE, simplisia daun sukun berasal dari Kecamatan Sewon, Kabupaten Bantul, Yogyakarta.

2. Uji KLT

Uji dilakukan dengan menghitung nilai Rf dari sampel standar dan sampel uji. Kemudian bercak hasil penotolan diamati dengan detektor UV₂₅₄ dan UV₃₆₆.

3. Kadar Flavonoid Total

Merupakan jumlah senyawa flavonoid yang berasal dari suatu tumbuhan yang dapat dinilai melalui analisis kuantitatif yang dinyatakan dalam satuan mg QE (*Quercetin Equivalen*)/g sampel dengan menggunakan standar baku kuersetin.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Ayakan mesh 40, *beaker glass* (Iwaki), bejana maserasi, cawan porselin, corong *glass* (Iwaki), erlenmeyer 500 mL (Iwaki), gelas ukur (Iwaki), grinder, kertas saring, labu ukur 10 mL (Iwaki), mikropipet (Ohaus), neraca analitik (Ohaus), oven, penangas air, pengaduk batang, pipet tetes, sendok spatula,

sendok tanduk, sonikator (*Cole Parmer Waterbath Sonicator*), spektrofotometer UV-Vis Genesys, tabung reaksi, termometer, toples kaca.

2. Bahan

Simplisia daun sukun, Aluminium Klorida (AlCl_3) (p.a Sigma po), aquades, etanol (p.a, Teknis), asam asetat (CH_3COOH) (Merck ®), asam format (Merck ®), aseton (Merck ®), kuersetin (Sigma-Aldrich), *blue tip*, kertas lebel, kertas saring, toluen (Merck ®), Plat KLT 60 F₂₅₄, *white tip*, *yellow tip*.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengumpulan Sampel dan Determinasi Tanaman

Sampel daun sukun didapatkan dari Kecamatan Sewon, Kabupaten Bantul, Yogyakarta. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta untuk mengetahui identitas dari tanaman daun sukun.

2. Persiapan Sampel

Sebanyak 3 kg daun sukun dipanen pada pagi hari, kerteria daun yang dipanen bagian daun yang hijau segar tidak teralu tua yaitu 3-5 tangkai dahan daun. Sampel disortasi basah untuk menghilangkan dari kotoran yang menempel, lalu dicuci menggunakan air mengalir untuk membersihkan tanah dan kotoran, dilanjutkan dengan pemotongan menjadi bagian kecil dan sampel dikeringkan selama 72 jam atau 3 hari menggunakan oven pada suhu 40°C apabila daun mudah hancur ketika diremas. Daun sukun yang sudah kering selanjutnya diserbuk haluskan dengan grinder, lalu diayak menggunakan ayakan nomor 40 mesh. Serbuk simplisia ditimbang sesuai kebutuhan, dan proses ekstraksi dilanjutkan (Mahdalena *et al.*, 2022).

3. Ekstraksi Daun Sukun

A. Metode Maserasi

Ekstraksi serbuk simplisia daun sukun dilakukan dengan teknik maserasi dengan perbandingan 1:10 b/v. Ekstraksi dengan metode maserasi dilakukan dengan cara ditimbang serbuk halus 100 g, kemudian direndam dalam maserator yang berisi 1000 mL pelarut etanol 96% selama 3 hari dan

diaduk tiap 8 jam. Daun sukun yang sudah diekstraksi dipisahkan filtrat dan ampasnya kemudian disaring dengan menggunakan saringan kertas, hingga diperoleh ekstrak bening (filtrat 1). Ampas ekstrak etanol 96% daun sukun diremaserasi menggunakan etanol 96% sebanyak 500 mL selama 1 hari diaduk setiap 8 jam kemudian disaring hingga diperoleh ekstrak bening (filtrat 2). Kedua filtrat yang diperoleh digabungkan, lalu dikentalkan atau diuapkan pelarutnya menggunakan kompor listrik dan wajan suhu 40°C. Hasil ekstrak ditimbang dengan cawan porselin yang sudah diketahui bobotnya, lalu dihitung nilai rendemen menggunakan rumus pada persamaan (2) (Fiana *et al.*, 2020).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

b. Metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE)

Proses ekstraksi UAE menggunakan pelarut 96% dengan perbandingan 1:10. 50 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam dua labu erlenmeyer 500 mL dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak masing-masing 500 mL. Untuk mendapatkan ekstrak terbaik, proses ekstraksi dilakukan selama 60 menit pada suhu 30°C (Candra, *et al.*, 2021). Filtrat dan ampas dipisahkan lalu, disaring dengan menggunakan saringan kertas, hingga diperoleh ekstrak bening (filtrat 1). Ampas ekstrak etanol 96% daun sukun diekstraksi kembali menggunakan etanol 96% sebanyak 500 mL selama 60 menit pada suhu 30°C kemudian disaring hingga diperoleh ekstrak bening (filtrat 2). Kedua ekstrak bening daun sukun digabungkan, lalu dipekatkan menggunakan kompor listrik dan wajan suhu 40°C untuk menghilangkan pelarut dari campuran ekstrak. Hasil akhir dari proses ini ialah untuk menghasilkan ekstrak daun sukun bebas pelarut (Yuliana, *et al.*, 2021). Hasil ekstrak ditimbang dengan cawan porselin yang diketahui bobotnya, lalu dihitung nilai rendemen menggunakan rumus pada persamaan (3) (Fiana, *et al.*, 2020).

$$Rendemen = \frac{Bobot Ekstrak}{Bobot Simplisia} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

c. Uji Organoleptik

Dari uji organoleptik pada ekstrak kental daun sukun terdapat tekstur, bau, warna dan rasa. Uji organoleptik “*bau khas*”, “*rasa pahit*”, “*tekstur kental*” dan “*warna coklat kehitaman*” dan lainnya. Setelah sampel terpapar udara selama 15 menit, bau ekstrak diamati. Bau ini hanya digunakan sebagai informasi deskriptif dan tidak dianggap sebagai standar kemurnian ekstrak (Kementerian Kesehatan RI, 2017).

d. Uji KLT

Plat KLT silika gel 60 F₂₅₄ sebagai fase diam dengan ukuran 4 x 10 (lebar x tinggi) diaktifkan menggunakan oven dengan suhu 100°C selama 30 menit. Plat KLT diambil lalu dibuat garis dengan jarak 1 cm dan 1 cm diatas dan bawah pada garis bawah ditotolkan standar kuersetin dan ekstrak daun sukun hasil maserasi dan UAE dengan jarak keduanya 1 cm. Asam format : aseton : toluena (2:4:4 v/v/v) digunakan sebagai sebagai fase gerak (Annegowda *et al.*, 2012). *Chamber* yang berisi fase gerak yang sudah jenuh, dimasukan plat KLT lalu ditutup dan ditunggu hingga eluen naik. Plat KLT dikeringkan dan diamati dibawah sinar UV₂₅₄ dan UV₃₆₆, selajutnya nilai R_f dihitung menggunakan rumus pada persamaan (4) (Fiana *et al.*, 2020).

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh analit}}{\text{jarak tempuh pelarut}} \dots \dots \dots (4)$$

4. Penentuan Kadar Flavonoid Total

a. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Ditimbang 10 mg standar kuersetin dan dilarutkan dengan etanol p.a sampai volume 10 mL hingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Dibuat seri kadar dari larutan induk standar kuersetin sampai didapatkan konsentrasi 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 ppm (Candra *et al.*, 2021).

b. Pembuatan larutan Alumunium Klorida (AlCl₃) 10%

Alumunium klorida 1 g ditambahkan aquadest dalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas, lalu homogenkan, dan didapatkan AlCl_3 10% .

c. Pembuatan Asam Asetat (CH_3COOH) 5%

12,5 mL asam asetat diambil, lalu diencerkan dengan aquadest dalam labu ukur 250 mL sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan CH_3COOH 5% dalam 250 mL.

d. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Larutan kuersetin 50 ppm diambil sebanyak 0,5 mL ditambahkan AlCl_3 10 % sebanyak 0,5 mL dan 4 mL CH_3COOH 5%. Diukur pada rentang panjang gelombang 400-800 nm dan diperoleh λ_{max} 415 nm (Candra *et al.*, 2021).

e. Penetapan *Operating Time*

Larutan kuersetin 50 ppm diambil sebanyak 0,5 mL, lalu ditambahkan AlCl_3 10% 0,5 mL dan 4 mL CH_3COOH 5%. Absorbansi diukur pada λ_{max} setiap 1 menit selama 60 menit, dan diperoleh absorbansi stabil pada menit 32 (Candra *et al.*, 2021).

f. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Kurva baku kuersetin dibuat dengan menggunakan kuersetin seri konsentrasi 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 ppm. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan 0,5 mL larutan seri kadar, lalu direaksikan 0,5 mL AlCl_3 10% dan CH_3COOH 5% sebanyak 4 mL (Candra *et al.*, 2021) kedalam larutan kemudian diamkan selama *operating time* yaitu selama 32 menit, larutan pada tabung reaksi ditentukan absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada λ_{max} 415 nm, lalu dibuat kurva antara konsentrasi kuersetin dengan absorbansi.

g. Pembuatan Larutan Uji

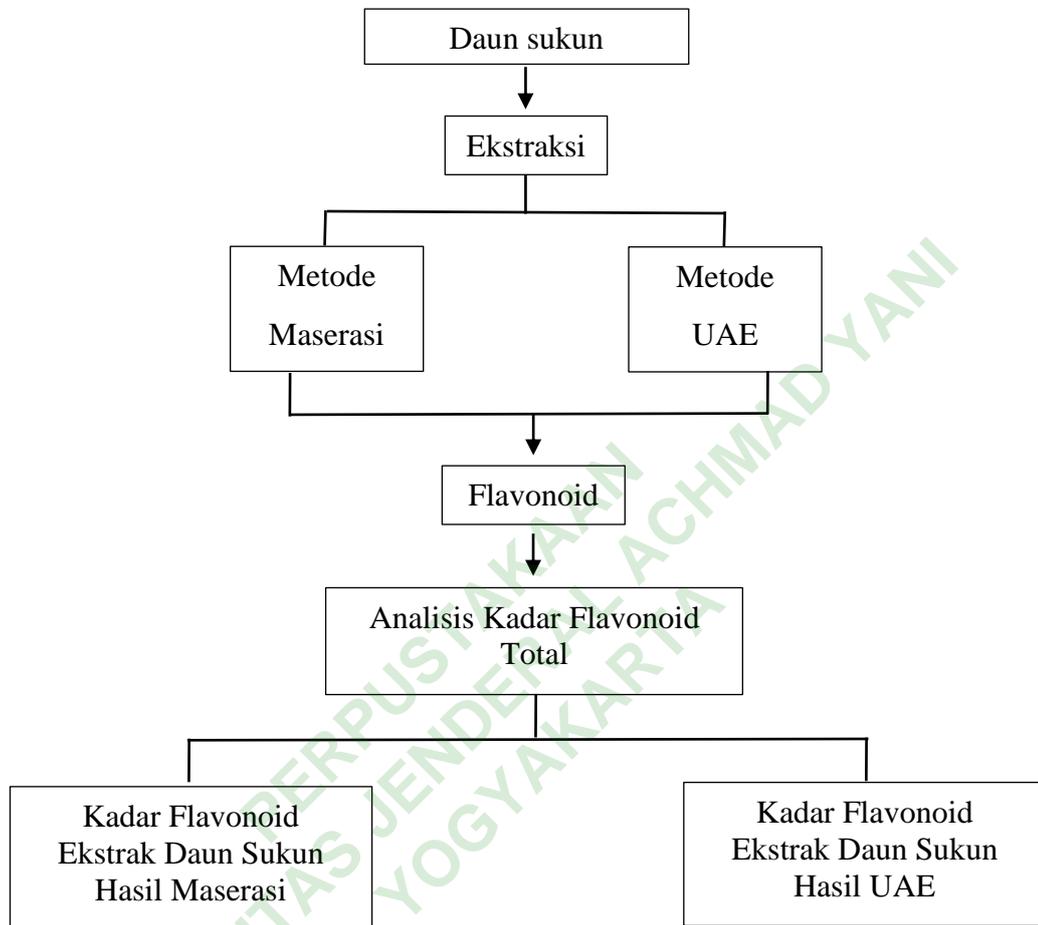
Ditimbang 100 mg ekstrak daun sukun hasil maserasi dan UAE, lalu dilarutkan dengan etanol p.a sampai volume 10 mL hingga diperoleh konsentrasi 10.000 ppm. 1,5 mL larutan induk sampel ditambahkan dengan etanol p.a dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. Konsentrasi akhir yang diperoleh adalah 1.500 ppm.

h. Penetapan Kadar Flavonoid Total

1,5 mL larutan sampel 1.500 ppm diambil 0,5 mL ditambah 0,5 mL AlCl_3 10%, ditambah 4 mL CH_3COOH 5% homogenkan (Candra *et al.*, 2021). Sampel diinkubasi selama 32 menit dan absorbansinya dibaca menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada λ_{max} 415 nm. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali untuk masing-masing sampel (Putri *et al.*, 2022)

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA

i. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 10. Pelaksanaan Penelitian

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penentuan nilai Rf plat KLT

Hasil uji KLT dibaca pada UV 254 dan 366 nm. Nilai Rf dihitung untuk setiap noda sampel dan standar. Kemudian, nilai Rf sampel dibandingkan dengan nilai Rf standar. Jika nilai Rf sampel dan standar saling mendekati atau sejajar menunjukkan adanya senyawa serupa atau mirip. Penentuan nilai Rf menggunakan persamaan (5).

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh analit}}{\text{jarak tempuh pelarut}} \dots \dots \dots (5)$$

Keterangan :

R_f = Retention Faktor atau Faktor Retensi

2. Penentuan Kadar Flavonoid

Penentuan senyawa flavonoid ditentukan dengan rumus pada persamaan (6).

$$\text{TFC} = \frac{\text{C.V.fp}}{\text{g}} \dots \dots \dots (6)$$

Keterangan :

TFC = Total Flavonoid Content (mg QE/g)

C = Konsentrasi Flavonoid (nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)

F_p = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g)

3. Analisis Statistika

Hasil uji kadar flavonoid total ekstrak daun sukun hasil maserasi dan UAE dianalisis dengan metode menggunakan Software *Statistical Package for Social Science* (SPSS). Uji homogenitas menggunakan uji *Levene's* dan uji Normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dengan taraf kepercayaan 95%. Apabila data homogen dan terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji-T *independent* dengan taraf kepercayaan 95%.