

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan uji eksperimental (*True Experiment*) secara kualitatif dan kuantitatif. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya pengaruh variasi konsentrasi ekstrak etanol terhadap kadar total tanin daun kupu-kupu.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

Lokasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Prodi Farmasi, Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai Juni 2024.

C. Sampel Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan sampel berupa daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.). Sampel tersebut berasal dari Kecamatan Playen, Gunung Kidul, Yogyakarta dengan karakteristik daun kupu-kupu yang memiliki daun masih segar berwarna hijau muda (urutan kedua sampai keempat dari pucuk tanaman).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas yang digunakan berupa pelarut etanol 70% dan etanol 96%.

2. Variable terikat

Variabel terikat yang digunakan berupa nilai Rf, dan kadar total tanin.

3. Variable terkontrol

Variabel terkontrol yang digunakan berupa pemilihan daun, waktu panen, suhu pengeringan, waktu maserasi, dan suhu penguapan ekstrak.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak etanol daun kupu-kupu diperoleh melalui ekstraksi maserasi dari serbuk daun kupu-kupu menggunakan etanol 70% dan etanol 96%.
2. Analisis kualitatif dari senyawa tanin menggunakan KLT dan dibaca nilai Rf.
3. Tanin total dinyatakan sebagai mg GAE (*Galat Acid Equivalent*) dalam satu gram.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Oven listrik (*Memmert*), grinder, tempat maserasi (toples kaca transparan), timbangan analitik (*Ohaus SW version 10S*), kompor listrik, panci, wajan, thermometer, sendok kayu, gelas ukur, *chamber* KLT, lampu UV, timbangan analitik (*Ohaus SW version 10S*), mikropipet, alat gelas, spatula, dan spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer*).

2. Bahan

Daun kupu-kupu, kain filter, pelarut etanol 70%, pelarut etanol 96%, reagen mayer, reagen wagner, reagen dragendrof, HCL, magnesium, dan FeCl₃, larutan fase gerak metanol : etil asetat (8 : 2), plat *silika gel* 60 F₂₅₄, *blue tip*, aquadest, pereaksi *Folin Ciocalteu* (Merck), asamgalat, Na₂CO₃ (Natrium Karbonat), asam galat (Merck), kertas saring, pipet tetes, dan kertas label.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Preparasi sampel

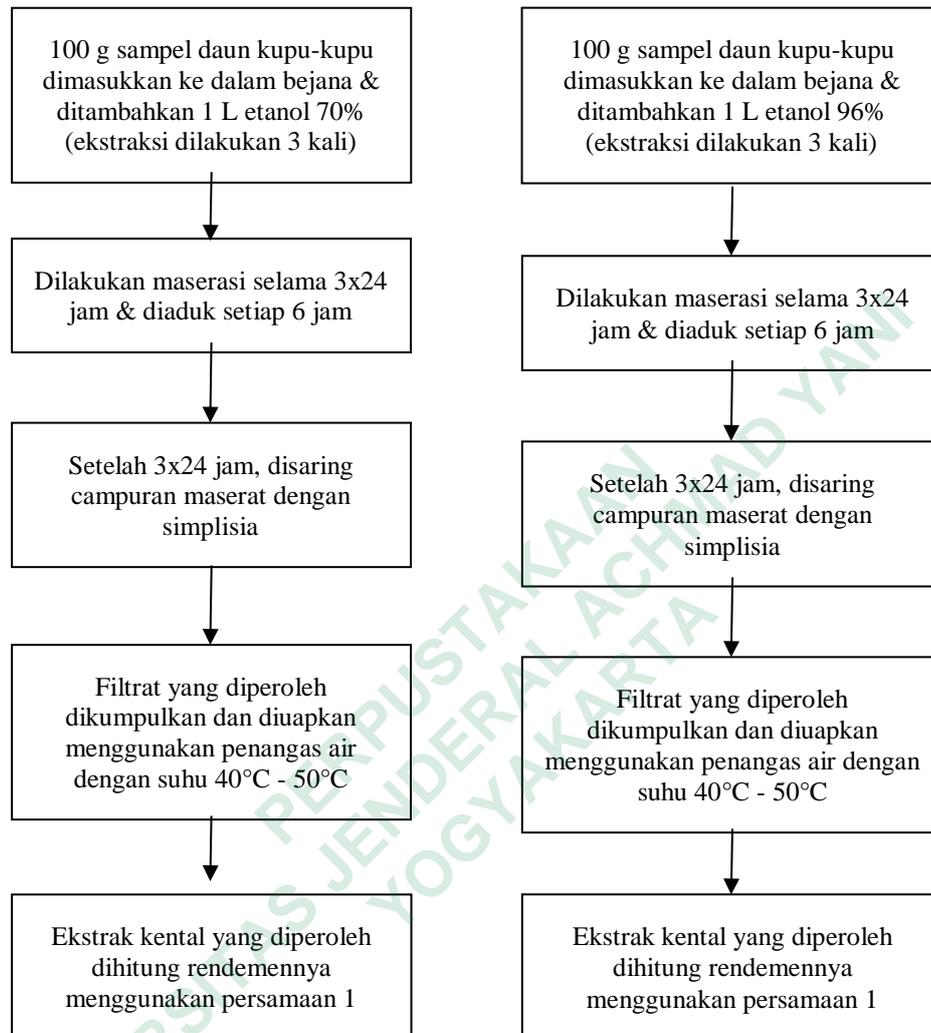
Penelitian ini menggunakan sampel yang berupa daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) yang masih muda memiliki warna hijau muda dan segar (urutan kedua sampai keempat dari pucuk tanaman) yang dipanen pada bulan Maret 2024. Dilakukan proses sortasi basah dengan tujuan agar kotoran yang menempel pada permukaan daun dapat dihilangkan. Kemudian daun yang sudah disortasi basah dicuci, lalu dilakukan perajangan. Perajangan pada sampel dimaksudkan untuk mempermudah proses pengeringan. Proses pengeringan daun kupu-kupu dilakukan dalam oven suhu 40°C. Pengeringan dikatakan baik apabila daun ditandai jika diremas mudah hancur. Tujuan dilakukan pengeringan ini untuk menurunkan kandungan kadar air dalam

simplisia. Selanjutnya, dilakukan penghitungan kadar air pada serbuk simplisia. Apabila hasil kadar air pada serbuk simplisia memenuhi syarat yang ditentukan, tahap selanjutnya yaitu sampel daun kupu-kupu dihaluskan hingga menjadi serbuk menggunakan alat *grinder*. Setelah itu, serbuk diayak pada ayakan berukuran 40 mesh hingga diperoleh serbuk yang lebih halus. Kemudian, serbuk disimpan dalam wadah bersih dan tertutup rapat agar langkah berikutnya dapat dilakukan (Purwasari, 2021).

2. Ekstraksi sampel

Berdasarkan penelitian Badra & Agustiana (2017) dan Mukhriani *et al.*, (2019) yang telah dilakukan, ekstraksi sampel pada penelitian ini dapat dilakukan dengan beberapa modifikasi. Penelitian ini menggunakan daun kupu-kupu yang diekstraksi sebanyak 3 kali masing-masing menggunakan metode maserasi dalam dua pelarut dengan konsentrasi berbeda yaitu etanol 70% dan etanol 96% dengan perbandingan 1:10 bagian. Selanjutnya jika sudah diperoleh ekstrak kental dilakukan perhitungan % rendemen, dapat dilihat pada persamaan:

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



Gambar 4. Alur ekstraksi daun kupu-kupu

3. Organoleptis ekstrak

Pengujian organoleptis pada penelitian ini bertujuan untuk menggambarkan bentuk, warna, bau, dan rasa pada ekstrak dengan cara menggunakan indera.

4. Uji Kadar Air

Dimasukkan ekstrak daun kupu-kupu yang sudah ditimbang sebanyak 500 mg dalam alat *Moisture balance* lalu ratakan ekstrak dan alat dijalankan, diperoleh hasil kadar air yang terdapat dalam ekstrak daun kupu-kupu.

5. Uji Fitokimia

Pada penelitian ini, skrining fitokimia kualitatif dilakukan menggunakan reagen khusus, untuk menentukan kandungan metabolit sekunder yang terdapat di dalam ekstrak daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.). Metabolit sekunder yang diuji terdiri dari alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, dan tanin (Parlin *et al.*, 2022)

a. Alkaloid

Dilakukan dengan reaksi mayer, wagner dan dragendrof. Diambil sebanyak 10 mg dari masing – masing ekstrak etanol 70% dan etanol 96% daun kupu-kupu dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dilarutkan, lalu ditambahkan sedikit larutan HCl 2N kedalam masing-masing tabung dan dikocok hingga homogen. Selanjutnya ditambahkan 3 tetes reaksi mayer kedalam tabung A, 3 tetes wagner ke dalam tabung B, dan 3 tetes dragendrof kedalam tabung C. Hasil positif apabila dalam tabung A terdapat endapan putih atau kuning terbentuk setelah penambahan reagen Mayer, dalam tabung B terdapat endapan coklat terbentuk setelah penambahan reagen Wagner, dan dalam tabung C terdapat endapan jingga atau merah pada uji dragendrof (Djuleng, 2021).

b. Flavonoid

Diambil masing – masing sebanyak 10 mg ekstrak etanol 70% dan etanol 96% daun kupu-kupu dimasukkan dalam tabung serta dilarutkan menggunakan pelarut. Ditambahkan 1 mg serbuk magnesium dan asam klorida pekat 5 tetes ke dalam masing-masing tabung dan dikocok kuat. Apabila sampel menjadi warna merah, kuning, atau oranye maka itu menunjukkan bahwa ada flavonoid (Djuleng, 2021).

c. Saponin

Diambil masing – masing sebanyak 10 mg ekstrak etanol 70% dan etanol 96% lalu dilarutkan dengan air 5 ml, kocok 1 menit akan menghasilkan busa dengan tinggi 1-10 cm, lalu diamati. Hasil menandakan positif saponin apabila menghasilkan busa yang bisa secara konstan bertahan selama ± 10 menit (Djuleng, 2021).

d. Tanin

Diambil masing-masing sebanyak 10 mg ekstrak etanol 70% dan etanol 96% daun kupu-kupu, dilarutkan dengan pelarut lalu diambil sebanyak 1 ml larutan tersebut dan tambahkan 5 tetes FeCl_3 1%. Hasil menandakan positif mengandung tanin apabila larutan menunjukkan warna biru tua atau hitam kehijauan (Djuleng, 2021).

6. Uji kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengidentifikasi tanin

a. Pembuatan fase gerak dan penjenuhan *chamber*

Langkah awal penentuan tanin pada penelitian ini dilakukan dengan optimasi fase gerak. Berdasarkan penelitian Aryantini (2021) fase gerak yang dapat digunakan adalah butanol : asam asetat : air (4:1:5), sedangkan berdasarkan penelitian Novia *et al.*, (2020) menggunakan methanol : etil asetat (8 : 2). Setelah diperoleh hasil optimasi fase gerak kemudian dimasukkan ke *chamber*, tutup rapat lalu dilakukan penjenuhan ditandai dengan fase gerak yang sudah membasahi seluruh kertas saring (Aryantini, 2021).

b. Pembuatan larutan ekstrak dan pembanding

Masing-masing ekstrak daun kupu-kupu dalam pelarut etanol 70% dan etanol 96% dibuat dengan konsentrasi 5000 ppm. Setelah itu, larutan standar asam galat dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm. Ekstrak daun kupu-kupu dan larutan standar asam galat ini kemudian digunakan dalam uji dan analisis lebih lanjut untuk menentukan kandungan senyawa aktif dan karakteristik kimia lainnya.

c. Uji KLT untuk identifikasi kandungan senyawa aktif

Fase diam menggunakan plat KLT *silika gel* 60 F₂₅₄, mempunyai lebar 4 cm, tinggi 10 cm serta diberi batas atas dan bawah 1 cm (digunakan plat *silika gel* yang sudah diaktifkan dengan pemanasan 30 menit pada suhu 100°C) lalu ditotolkan larutan standar dan ekstrak daun kupu-kupu menggunakan pipa kapiler di bagian garis plat bawah. Dimasukkan plat *silika gel* ke dalam chamber yang sudah jenuh dan tutup rapat, amati hingga eluen naik hingga batas atas. Diambil plat dan keringkan, diamati dibawah lampu UV pada λ_{254} dan λ_{366} nm (Cahyaningsih *et al.*, 2017).

7. Penentuan kadar total tanin

a. Pembuatan Larutan Sampel

Ditimbang sebanyak 50 mg masing-masing ekstrak etanol 70% dan etanol 96% daun kupu-kupu, lalu dilarutkan menggunakan etanol pa hingga 10 ml homogenkan.

b. Pembuatan larutan standar asam galat

Sebanyak 10 mg asam galat dilarutkan menggunakan aquadest hingga volume mencapai 10 ml di labu takar dan didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Larutan stok yang diperoleh kemudian digunakan untuk membuat seri larutan dengan konsentrasi yang berbeda-beda, yaitu 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm, dan 140 ppm. Untuk setiap konsentrasi, ambil volume yang tepat dari larutan stok dan tambahkan aquadest hingga volume total mencapai 10 ml. Pastikan setiap larutan disiapkan dengan teliti untuk memastikan konsentrasi yang akurat.

c. Pembuatan larutan natrium karbonat 35%

Sebanyak 35 gram natrium karbonat (Na_2CO_3) ditimbang dengan tepat dan dimasukkan ke dalam gelas beker. Kemudian, tambahkan aquadest hangat secukupnya ke dalam gelas beker dan dilakukan proses pencampuran dengan alat *ultrasound*, tambahkan aquadest hingga volume total larutan mencapai 100 ml. (Utomo & Rizki, 2023).

d. Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat

Sebanyak 500 μl dari larutan asam galat dengan konsentrasi 100 ppm masuk dalam labu takar. Lalu tambahkan 500 μl reagen *Folin-Ciocalteu* ke dalam labu takar tersebut. Setelah itu tambahkan 1000 μl (1 ml) natrium karbonat (Na_2CO_3) 35% ke dalam campuran. Selanjutnya, tambahkan aquadest hingga volume total campuran mencapai 10 ml dalam labu takar. Larutan kemudian digojog atau dikocok hingga homogen. Setelah campuran homogen, absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 700-770 nm (Thakur & Kumari, 2022).

e. Penentuan *operating time*

Sebanyak 500 μl dari larutan asam galat dengan konsentrasi 1000 ppm dimasukkan ke dalam labu takar. Setelah itu, tambahkan 500 μl reagen *Folin-Ciocalteu* ke dalam larutan asam galat tersebut. Kemudian, tambahkan 1000 μl (1 ml) natrium karbonat (Na_2CO_3) 35% ke dalam campuran. Selanjutnya, tambahkan aquadest hingga volume total campuran mencapai 10 ml dalam labu takar. Campuran tersebut digojog atau dikocok hingga homogen. Nilai absorbansi yang konstan diperoleh menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan frekuensi waktu 1 menit untuk mengukur panjang gelombang maksimum (Thakur & Kumari, 2022).

f. Pembuatan kurva standar asam galat

Sebanyak 500 μl dari larutan asam galat dengan konsentrasi 100 ppm dimasukkan ke dalam labu takar. Setelah itu, tambahkan 500 μl reagen *Folin-Ciocalteu* ke dalam larutan asam galat tersebut. Kemudian, tambahkan 1000 μl (1 ml) natrium karbonat (Na_2CO_3) 35% ke dalam campuran. Selanjutnya, tambahkan aquadest hingga volume total campuran mencapai 10 ml dalam labu takar. Campuran tersebut digojog atau dikocok hingga homogen, lalu diamkan selama *operating time* untuk memastikan reaksi berjalan sempurna. Nilai absorbansi sampel dibaca pada spektrofotometer UV-Vis pada λ maksimum, dan dilanjutkan dengan pembuatan kurva yang menghasilkan adanya korelasi antara kadar asam galat (ppm) dengan absorbansi.

g. Pengujian kadar total tanin

Diambil sebanyak 500 μl dari masing-masing ekstrak etanol 70% dan etanol 96% ke dalam labu takar, ditambahkan 500 μl reagen *Folin Ciocalteu* lalu ditambahkan larutan Na_2CO_3 35% sebanyak 1000 μl ditambah aquadest sampai 10 ml selanjutnya inkubasi selama *operating time* pada suhu ruang lalu absorbansinya dibaca pada λ maksimum. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali (Thakur & Kumari, 2022).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penentuan Rf hasil KLT

Perhitungan nilai Rf (*Retention factor*) dapat dilakukan menggunakan rumus dibawah ini (Usman & Muin, 2023) :

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa dari titik asal}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut dari titik asal}}$$

2. Penentuan kadar total tanin

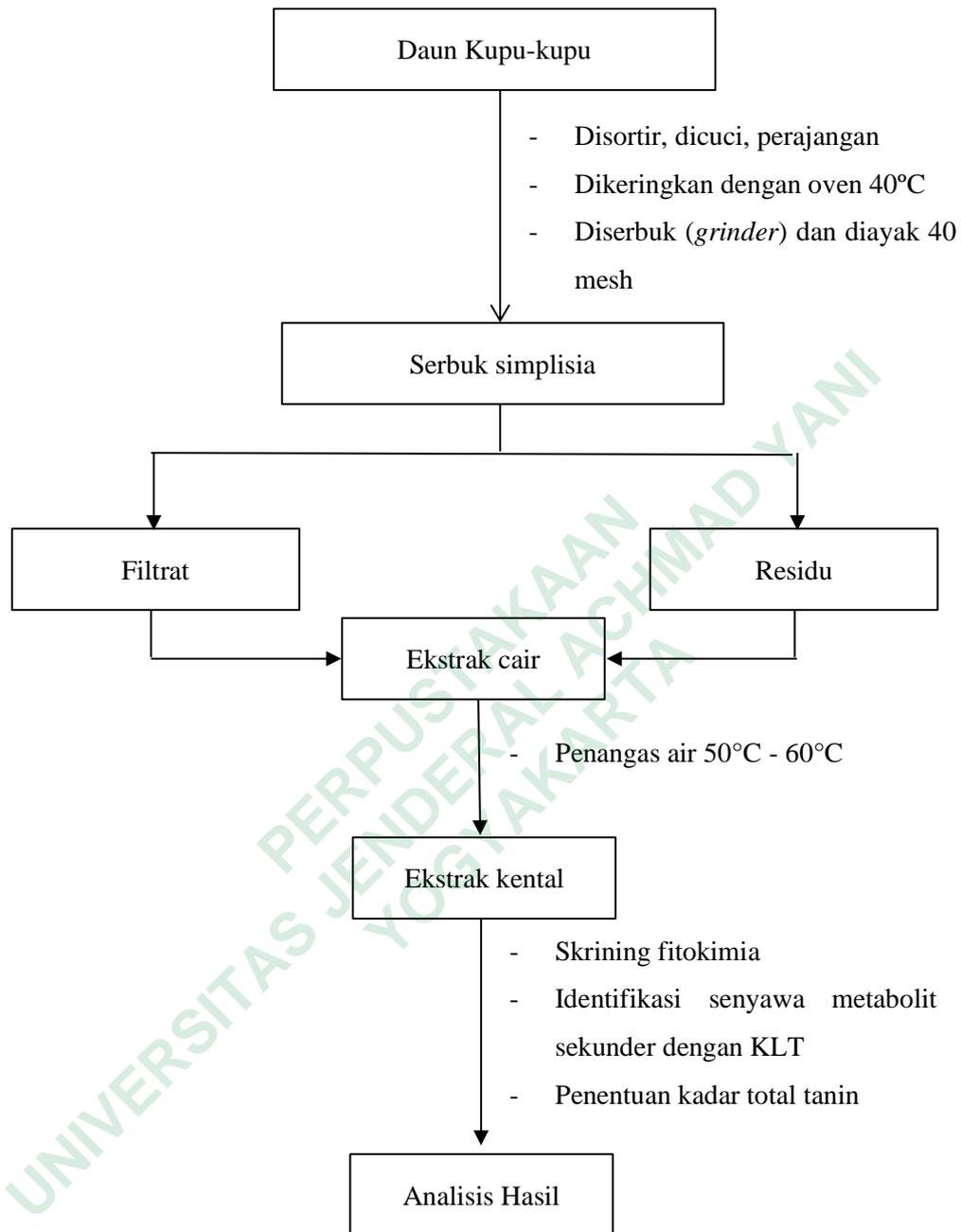
Analisis data uji kadar total tanin dilakukan dengan menghitung persamaan dari masing-masing ekstrak etanol 70% dan etanol 96% daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.). Standar untuk analisis tanin yang digunakan yaitu standar asam galat. Kadar senyawa tanin dapat dihitung dengan satuan mg GAE/gram menggunakan persamaan berikut (Basri *et al.*, 2023) :

$$\text{Total Tanin} = \frac{C.V.FP}{g}$$

Keterangan : C	= konsentrasi tanin (nilai x)
V (Volume)	= jumlah ekstrak yang digunakan (mL)
FP	= faktor pengenceran
g	= massa sampel yang digunakan (gram).

3. Analisis data

Tujuan analisis ini ialah untuk mengetahui bagaimana perbedaan konsentrasi pelarut ekstrak yang digunakan (etanol 70% dan etanol 96%) berdampak pada kadar tanin total daun kupu-kupu. Karena sampel yang digunakan tidak lebih dari 50, sehingga uji normalitas Shapiro Wilk digunakan dan varian data dari setiap kelompok diuji dengan uji keseragaman (homogenitas) Levene. Selanjutnya, uji T independen dan Mann Whitney dilakukan. Uji T independen dapat digunakan pada data yang normal dan homogen, sedangkan uji Mann Whitney dapat digunakan pada data yang tidak normal dan homogen.



Gambar 5. Alur Penelitian