

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan metode pendekatan kualitatif dan kuantitatif melalui eksperimen laboratorium. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh ekstraksi terhadap kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak daun mengkudu dengan pelarut etanol 50%. Penelitian ini dimulai dari pengumpulan simplisia, determinasi, pengeringan, hingga ekstraksi daun mengkudu dengan metode UAE. Analisis kualitatif yang dilakukan berupa uji skrining fitokimia dan identifikasi senyawa flavonoid dengan kromatografi lapis tipis. Analisis kuantitatif berupa penentuan kadar fenolik dan flavonoid total daun mengkudu. *Total Phenolic Compound* (TPC) ditentukan menggunakan standar asam galat sedangkan *Total Flavonoid Compound* (TFC) ditentukan menggunakan standar kuersetin. Penentuan kadar fenolik dan flavonoid total dilakukan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biofarmakologi Program Studi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan Mei- Juni 2025.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Daun mengkudu sebagai subjek penelitian yang didapatkan di daerah pekarangan rumah warga RT 002 RW 008 Piji, Balong, Girisubo, Kabupaten Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta (-8.149108, 110. 704075).

2. Sampel

Tanaman yang digunakan pada pengujian ini adalah daun mengkudu, dipanen sebanyak 7 kg dengan kriteria daun berwarna hijau (berada pada bagian daun ke-4 sampai ke-5 dari pucuk tanaman)

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: Durasi ekstraksi daun mengkudu 20, 40, 60 menit.
2. Variabel terikat: Penentuan nilai kadar flavonoid dan fenolik total dari daun mengkudu.
3. Variabel terkontrol: Karakteristik daun, waktu panen, suhu pengeringan simplisia, metode ekstraksi, suhu ekstraksi, pelarut, dan suhu pengentalan.

E. Definisi Operasional

1. Pelarut yang digunakan adalah etanol 50 % yang berfungsi untuk melarutkan senyawa bioaktif dari serbuk daun mengkudu.
2. *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) adalah teknik ekstraksi yang memanfaatkan prinsip kavitasi akustik, yang menghasilkan gelembung spontan (kavitasi) pada fase cair di bawah titik didih.
3. Kromatografi lapis tipis adalah salah satu teknik kromatografi yang digunakan untuk memisahkan dan mengidentifikasi senyawa dalam suatu campuran berdasarkan perbedaan kepolaran dan interaksi antara fase diam serta fase gerak.
4. Kadar Fenolik Total: Jumlah total senyawa fenolik dalam ekstrak yang diukur menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis. Hasil analisis dinyatakan dalam satuan *Gallic Acid Equivalent* (GAE/g), di mana sumbu x pada grafik merepresentasikan konsentrasi total fenol dalam larutan.
5. Kadar Flavonoid Total: Jumlah total flavonoid dalam ekstrak yang dihitung menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis. Hasil analisis dinyatakan dalam satuan *Quercetin Equivalent* (QE/g), di mana sumbu y pada grafik merepresentasikan konsentrasi total flavonoid dalam larutan.
6. Spektrofotometri UV- Vis adalah: Teknik analisis yang mengukur absorbansi cahaya oleh suatu sampel pada rentang panjang gelombang *ultraviolet* (200–400 nm) dan cahaya tampak (400–800 nm).
7. Karakteristik daun yang digunakan yaitu: berwarna hijau, daun ke 4 dan ke 5, tidak berlubang, tidak berjamur, tidak robek.

F. Alat dan Bahan

1. Alat:

Alat yang digunakan diantaranya yaitu: Ayakan 40 mesh, botol ekstrak (*vial*), erlenmeyer (*iwaki*), gelas ukur (*iwaki*), grinder (*Fomac*), penagas air, bejana sonikator (*GT sonic*), timbangan analitik (*Ohaus*), mikropipet (*socorex*), oven (*memmert UN160*), lampu UV 254 dan 366 nm, gelas beaker (*iwaki*), kaca arloji, labu takar (*iwaki*), mikropipet (*socorex*), pipet tetes, spektrofotometer UV-Vis *double beam* (*Thermo Scientific Genesis 10S*), tabung reaksi (*iwaki*), *magnetic stirrer*, pipet ukur, kaca arloji, cawan porselin, propipet, tabung reaksi (*iwaki*), *chamber KLT* (*Camag*), pipa kapiler (*Camag*), *waterbath* (*Mammert*).

2. Bahan:

Daun mengkudu, pelarut etanol 50%, *plate KLT silica gel GF60* (*Merck*), butanol *p.a* (*Merck*), asam asetat glasial (CH_3COOH) *p.a* (*Merck*), akuades *p.i*, *blue tip*, standar kuersetin (*Merck*), AlCl_3 *p.a* (*Merck*), standar asam galat (*Merck*), metanol *p.a* (*Merck*), reagen *Folin Ciocalteu* (*Merck*), reagen *wagner*, reagen *mayer*, reagen *dragendorff*, FeCl_3 *p.a* (*Merck*), HCl pekat *p.a* (*Mallinckrodt*), HCl 2N, magnesium *p.a* (*Merck*), Natrium Karbonat Anhidrat *p.a* (*Merck*), kertas saring, akuades (Teknis), etanol *p.a* (*Merck*), Kloroform *p.a* (*Merck*).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Dilakukan determinasi dengan pengambilan foto sampel daun mengkudu dari Pekarangan rumah warga RT 002 RW 008 Piji, Balong, Girisubo, Kabupaten Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Determinasi tanaman daun mengkudu dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan. Determinasi daun mengkudu menggunakan foto daun, batang, dan buah dengan tujuan untuk memastikan morfologi tanaman agar tidak ada kesalahan dalam pengambilan sampel.

2. Preparasi Sampel

Daun mengkudu yang telah di determinasi kemudian dilakukan pemanenan dengan kriteria daun berwarna hijau berada pada bagian daun ke-4 dan ke-5 dari pucuk tanaman. Pengambilan daun dilakukan pada pagi hari dengan tujuan untuk memastikan bahwa proses fotosintesis belum berlangsung secara optimal. Daun mengkudu yang sudah dipanen kemudian dilakukan penyortiran, dicuci secara perlahan menggunakan air mengalir untuk mencegah kerusakan. Kemudian daun dikeringkan di dalam oven pada suhu 40°C selama 4 hari atau mencapai kondisi kering sempurna, dan ditandai dengan teksturnya yang rapuh saat diremas. Setelah proses pengeringan selesai, daun ditimbang dan dihaluskan menjadi serbuk menggunakan *grinder*, lalu diayak menggunakan ayakan dengan ukuran *mesh* 40.

3. Ekstraksi Sampel

Sebanyak 450 g serbuk simplisia diekstraksi menggunakan pelarut etanol 50% dengan metode UAE. Total serbuk yang digunakan sebanyak 450 g terbagi masing-masing 150 g tiap variasi durasi. Setiap durasi ekstraksi dilakukan 3 kali pengulangan dengan masing-masing berat 50 g serbuk, dan rasio pelarut 1:10 pada suhu 55°C selama 20, 40, dan 60 menit. Ekstrak yang diperoleh kemudian disaring dan diuapkan pada suhu 40°C dengan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental. Selanjutnya, rendemen ekstrak dihitung menggunakan persamaan (2):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

4. Uji Organoleptis

Setelah dilakukan pengentalan, daun mengkudu dilakukan pengujian organoleptik untuk mengetahui kualitas suatu ekstrak yang meliputi bentuk, warna, dan aroma ekstrak yang dihasilkan.

5. Uji Kadar Kelembapan

Sebanyak 1 g ekstrak dimasukkan ke dalam alat *moisture balance* dan diratakan secara merata. Alat kemudian dioperasikan pada suhu 105°C hingga indikator hijau menyala. Ekstrak dikategorikan memiliki kadar air yang baik apabila kadar airnya kurang dari 10%.

6. Uji Penapisan Fitokimia

a. Pembuatan larutan uji

Ditimbang saksama 0,2 g ekstrak dari masing masing durasi. kemudian ekstrak dilarutkan dalam 10 mL metanol *p.a* di dalam *beaker glass* hingga larut. Kemudian ekstrak yang telah larut di saring menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Setelah itu, ditambahkan metanol *p.a* hingga mencapai tanda batas.

b. Alkaloid

Sebanyak 1 mL larutan uji dari masing-masing durasi diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, dilakukan uji alkaloid menggunakan reagen *Wagner*, *Mayer*, dan *Dragendorff*. Pada masing-masing tabung reaksi Ditambahkan 1 mL larutan HCl 2N, lalu ditetaskan beberapa tetes reagen yang sesuai hingga terlihat perubahan warna atau terbentuk endapan. Hasil positif pada reagen *Mayer* ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih, reagen *Wagner* menghasilkan endapan coklat, sedangkan reagen *Dragendorff* menunjukkan endapan berwarna jingga kecoklatan.

c. Flavonoid

Diambil 1 mL larutan uji pada setiap durasi, kemudian dimasukan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan 0,2 g serbuk magnesium dan diberi HCl pekat hingga larutan berubah warna. Hasil dinyatakan positif jika larutan berubah warna menjadi kuning, merah, atau jingga.

d. Fenolik

Diambil 1 mL larutan uji dari setiap durasi, kemudian dimasukan ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan. Kemudian ditambahkan FeCl_3 5% hingga larutan berubah warna. Jika membentuk warna hijau atau hijau kebiruan menyatakan positif mengandung senyawa fenolik.

e. Saponin

Diambil sebanyak 10 mg dari masing-masing durasi ekstrak daun mengkudu dan dilarutkan dengan 2 mL etanol 50%, lalu tambahkan 2 mL air panas dan HCl 2N 1 mL Kemudian campuran dikocok selama 10 detik.

Dikatakan positif saponin apabila terbentuk busa setinggi 1–10 cm yang stabil.

f. Tanin

Diambil 1 mL larutan uji dari setiap durasi, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan larutan FeCl_3 1% hingga larutan berubah warna. Dinyatakan hasil positif apabila terjadi perubahan warna menjadi biru hingga kehitaman.

7. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Penjenuhan *chamber*

Disiapkan fase gerak hasil optimasi untuk uji senyawa fenolik yakni n-heksana: etil asetat: etanol (1:8:1) (v/v/v) dan fase gerak untuk uji senyawa flavonoid yakni etanol: etil asetat: kloroform (1,5:2:8,5) (v/v/v). Fase gerak deteksi senyawa fenolik dan flavonoid disiapkan secara terpisah dan ditempatkan pada *chamber* berbeda. Selanjutnya fase gerak dimasukkan ke dalam *chamber*, kemudian kertas saring berukuran 18 cm × 2 cm dipasang di setiap *chamber*, lalu ditutup rapat hingga jenuh, ditandai seluruh permukaan kertas saring terbasahi fase gerak.

b. Pembuatan larutan uji

Sebanyak 100 mg ekstrak dari tiap durasi dilarutkan dalam 10 mL metanol *p.a* (10.000 ppm). Standar asam galat (fenolik) dan kuersetin (flavonoid) masing-masing dibuat dengan melarutkan 10 mg dalam 10 mL metanol *p.a* (1.000 ppm).

c. Prosedur KLT

Fase diam yang digunakan berupa plat KLT *silica gel* F₂₅₄ berukuran 10 × 5 cm yang diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit. Setelah diaktifkan, plat diberi totolan masing-masing 2 µL ekstrak dari setiap durasi serta larutan standar dengan menggunakan pipa kapiler ukuran 1 µL. Kemudian, dimasukkan plat KLT ke dalam *chamber* dan ditutup rapat, tunggu hingga eluen terelusi (± 20 menit). Setelah terelusi kemudian plat dikeluarkan dari *chamber* dan dikering-anginkan pada suhu ruang hingga kering. Noda yang terbentuk dilihat pada

UV 254 nm dan 365 nm. Lalu, dihitung R_f (*Retardation Factor*) yang didapatkan dengan persamaan (3)

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh analit}}{\text{Jarak tempuh pelarut}} \dots\dots\dots (3)$$

8. Penetapan Kadar Fenolik Total

Penetapan kadar fenolik total dengan menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan mengacu pada prosedur Chun *et al.*, (2003) dalam Nurhasanah *et al.*, (2024) sebagai berikut:

a. Pembuatan Larutan Baku Standar Asam Galat

Sebanyak 10 mg asam galat ditimbang, lalu dilarutkan dengan metanol *p.a* hingga volumenya 10 mL sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan induk 1000 ppm dibuat seri konsentrasi 100, 150, 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm.

b. Pembuatan Larutan Natrium Karbonat (Na_2CO_3) 7%

Sebanyak 7 g Na_2CO_3 dilarutkan dengan akuades hangat secukupnya, setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Kemudian tambahkan akuades hingga volume total larutan mencapai 100 mL dan disonikasi menggunakan alat ultrasonik untuk memastikan pencampuran merata.

c. Penentuan Panjang Gelombang (λ) Maksimum

Diambil 0,1 mL larutan dari konsentrasi 300 ppm standar asam galat. Tambahkan 0,1 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, 1 mL larutan Na_2CO_3 7%, dan WFI hingga volume mencapai 5 mL. Selanjutnya, dibaca absorbansi diukur pada 600-800 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimum.

d. Penentuan *Operating Time* (OT)

Dicampurkan 0,1 mL larutan asam galat konsentrasi 300 ppm tambahkan reagen *Folin-Ciocalteu* 0,1 mL, 1 mL larutan Na_2CO_3 7%, dan tambahkan WFI hingga mencapai volume total 5 mL. Dilakukan pengukuran selama 2 jam dengan interval waktu tiap satu menit pada

panjang gelombang maksimal yang diperoleh hingga mencapai reaksi yang stabil.

e. Pembuatan Kurva Baku Standar Asam Galat

Sebanyak 0,1 mL larutan standar asam galat pada setiap seri konsentrasi kemudian ditambahkan 0,1 mL reagen *Folin-Ciocalteu* lalu dikocok hingga merata. Kemudian ditambahkan 1 mL larutan Na_2CO_3 7% ke dalam campuran, kocok kembali, kemudian tambahkan WFI hingga volume total mencapai 5 mL. Campuran tersebut kemudian diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh. Setelah inkubasi, absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan, dan proses ini diulang sebanyak tiga kali.

f. Penentuan Kadar Fenolik Total

Ditimbang seksama 100 mg ekstrak daun mengkudu pada masing masing durasi kemudian ditambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas 10 ml (konsentrasi 10.000 ppm). Lalu diambil 0,1 mL, ditambahkan pereaksi *Follin-Ciocalteu* 0,1 mL dan disonikasi. Setelah itu, Ditambahkan 1 mL natrium karbonat 7% dan WFI hingga volume 5 mL, disonikasi sampai merata. Diamkan pada suhu kamar selama waktu *operating time* yang diperoleh. Dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dan diulangi sebanyak 3x. *Total Phenolic Content* dinyatakan dalam milligram setara asam galat (GAE) per gram sampel. Kadar fenolik ditentukan dengan persamaan (4):

$$\text{TPC} = \frac{c \cdot V \cdot fp}{g} \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan:

TPC = *Total Phenolic Content*

C = Konsentrasi fenolik (nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (ml)

Fp = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g)

9. Penetapan kadar flavonoid total

Penetapan kadar flavonoid total dengan mengacu pada prosedur Chang *et*

al., (2020) dalam Nurhasanah *et al.*, (2024) sebagai berikut:

a. Pembuatan Larutan Baku Standar Kuersetin

Sebanyak 10 mg kuersetin ditimbang, kemudian dilarutkan dengan metanol *p.a* hingga volume 10 mL sehingga diperoleh larutan induk 1000 ppm. Dari larutan induk dibuat seri konsentrasi 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm.

b. Pembuatan larutan CH₃COOH 5%

Sebanyak 5 mL asam asetat (CH₃COOH) pekat dicampurkan dengan akuades dalam gelas beaker, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL. Selanjutnya, akuades ditambahkan hingga volume larutan mencapai 100 mL.

c. Pembuatan larutan AlCl₃ 10%

Sebanyak 10 g AlCl₃ dilarutkan dengan akuades secukupnya, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

d. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Diambil larutan stok kuersetin 1 mL dari konsentrasi 80 ppm, dicampur dengan 1 mL AlCl₃ 10% kemudian ditambahkan CH₃COOH 5% sampai tanda batas 10 mL. Dibaca absorbansinya pada rentang panjang gelombang λ 350-450 nm.

e. Penentuan *Operating Time* (OT)

Diambil larutan stok kuersetin 1 mL dari konsentrasi 80 ppm, ditambahkan 1 mL AlCl₃ 10% kemudian ditambahkan CH₃COOH 5% sampai tanda batas 10 mL. *Scanning* absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan sebelumnya dan dilakukan pengukuran selama 45 menit dengan interval waktu tiap satu menit, hingga mencapai reaksi yang stabil.

f. Pembuatan Kurva Baku Standar Kuersetin

Pipet 1 mL tiap konsentrasi dalam larutan stok kuersetin kemudian, ditambahkan 1 mL AlCl₃ 10% kemudian ditambahkan CH₃COOH 5% sampai tanda batas 10 mL. Diinkubasi dalam suhu ruang dengan waktu

operating time yang telah diperoleh. Dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dan diulangi 3 kali.

g. Penetapan kadar flavonoid total

Ditimbang dengan seksama 100 mg ekstrak mengkudu larutkan dalam metanol *p.a* sampai tanda batas 10 mL untuk mendapatkan konsentrasi 10.000 ppm. Sebanyak 1 mL dari larutan ekstrak ditambahkan 1 mL AlCl₃ 10% kemudian ditambahkan CH₃COOH 5% sampai tanda batas 10 mL, kemudian di inkubasi pada suhu ruang dengan waktu *operating time* yang telah diperoleh. Dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang sudah didapatkan dan ulangi pengukuran sebanyak tiga kali. Kadar flavonoid ditentukan dengan persamaan (5):

$$TFC = \frac{c.v.f_p}{g} \dots\dots\dots (5)$$

Keterangan:

- TFC = Total Flavonoid content
 C = Konsentrasi flavonoid (nilai x)
 V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)
 Fp = Faktor pengenceran
 g = Berat sampel yang digunakan (g)

H. Metode Pengolahan Data

1. Analisis Kadar Fenolik Total dan Flavonoid Total

Analisis Kadar fenolik dan flavonoid total diawali dengan regresi linier. Absorbansi merupakan variabel y dan konsentrasi larutan adalah variabel x. Penentuan kadar fenolik dan flavonoid daun mengkudu dengan persamaan (6):

$$y = b x + a \dots\dots\dots (6)$$

Keterangan:

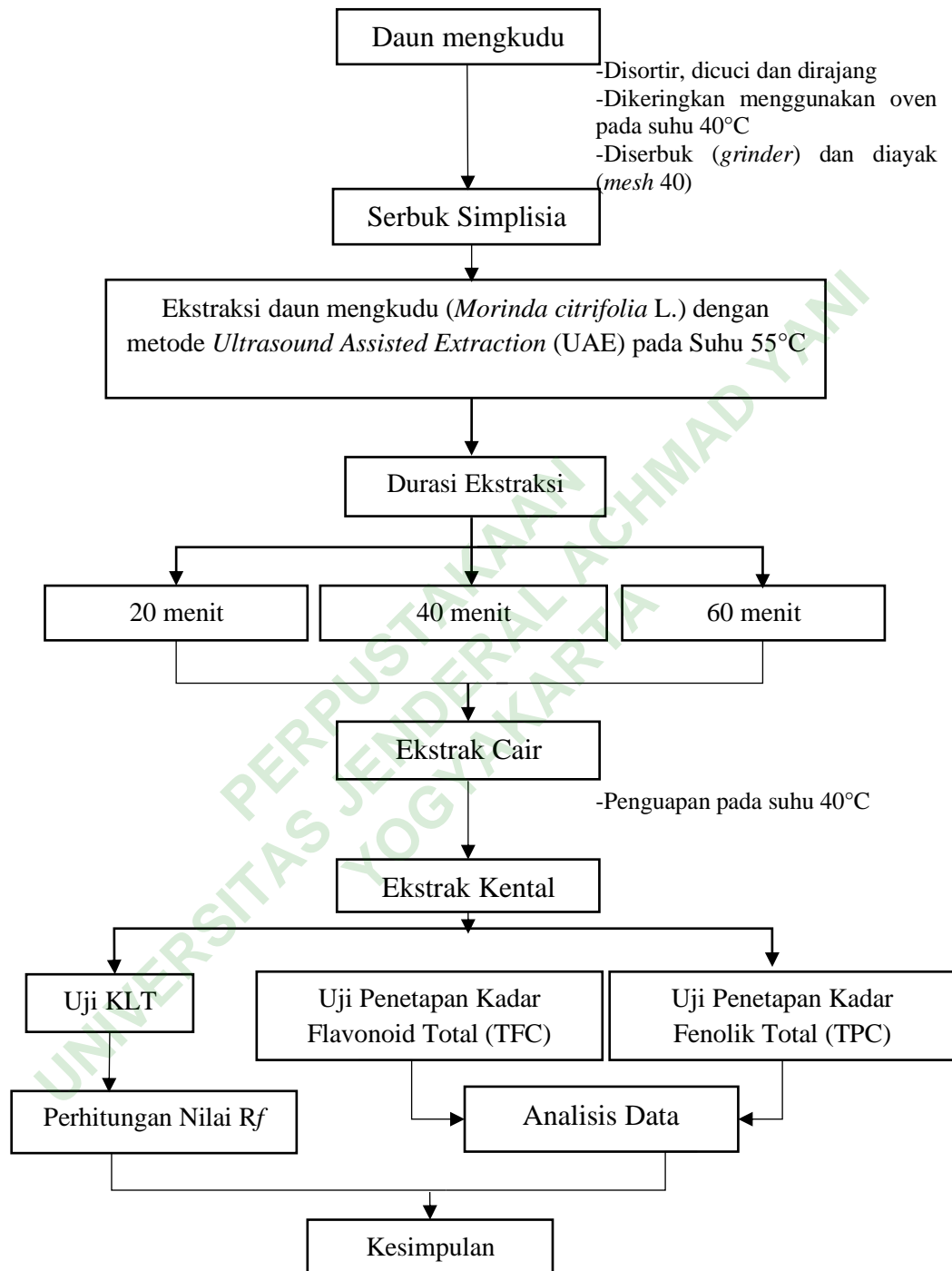
- y = absorbansi
 b = intersep
 x = konsentrasi/kadar senyawa
 a = *slope* (kemiringan)

Setelah didapatkan persamaan $y = b x + a$ maka selanjutnya dilakukan analisis data untuk memperoleh kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak.

2. Analisis Data

Pengolahan data secara statistik menggunakan SPSS. Langkah-langkah uji SPSS sebagai berikut: Uji homogenitas data dilakukan dengan *Levene test* sedangkan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk test*. Signifikansi kedua uji tersebut ditentukan dengan kriteria $p > 0,05$. Jika data memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas, maka dilakukan uji *One-Way ANOVA*, yang kemudian dilanjutkan dengan *Post-Hoc Tukey* untuk melihat perbedaan antar tiap durasi ekstraksi.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANUWIS
YOGYAKARTA

Alur Penelitian :**Gambar 7. Skema Pelaksanaan Kerja**