

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Rancangan penelitian ini yaitu eksperimental laboratorium bertujuan menetapkan kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) yang paling tinggi, dengan memvariasikan konsentrasi etanol. Penelitian ini dimulai dari pengumpulan simplisia, determinasi tanaman, hingga ekstraksi daun kupu-kupu dengan etanol konsentrasi 70% dan 96% menggunakan maserasi. *Total Phenolic Compound* (TPC) ditentukan menggunakan standar asam galat sedangkan *Total Fenolic Compound* (TFC) ditentukan menggunakan standar kuersetin. Penetapan kadar fenolik dan flavonoid total menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis.

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Program Studi Farmasi (S-1) Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan Maret 2024 -Juni 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) sebagai subjek penelitian didapatkan dari Ngawu, Playen, Gunung Kidul, Yogyakarta dengan titik koordinat -7.9378510, 110.5445590.

2. Sampel

Tanaman yang digunakan adalah daun kupu-kupu, dipanen sebanyak mungkin dengan syarat daun berwarna hijau muda (berada pada bagian daun ke-2 hingga ke-4 dari pucuk tanaman) dan berukuran seragam (\pm 5-7 cm).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: variasi konsentrasi etanol ekstrak daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.)
2. Variabel terikat: kadar flavonoid dan fenolik total ekstrak etanol daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) menggunakan Spektrofotometri uv-vis
3. Variabel terbatas: waktu panen, suhu pengeringan, waktu ekstraksi, metode ekstraksi, suhu dan lama pengadukan selama maserasi.

E. Definisi Operasional

1. Pelarut etanol dengan konsentrasi 70% dan 96%.
2. Metode ekstraksi menggunakan maserasi.
3. Asam galat merupakan standar untuk mengukur kadar fenolik total sedangkan kuersetin merupakan standar untuk mengukur kadar flavonoid total.
4. Dalam penelitian ini, kadar fenolik total dihitung menggunakan perhitungan *Total Phenolic Content* (TPC) dalam satuan ekuivalen asam galat (GAE). Sumbu x menunjukkan kadar fenol total larutan (C), yang diperoleh dari sumbu y (absorbansi sampel) pada persamaan regresi linier standar asam galat
5. Dalam penelitian ini, kadar flavonoid dapat dihitung dalam satuan *Equivalen Quersetine* (EQ) dengan perhitungan TFC (*Total Flavonoid Content*) yang ditentukan dari absorbansi sampel (sumbu y) pada persamaan regresi linier kuersetin
6. Spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk menetapkan kadar fenolik dan flavonoid total

F. Alat dan Bahan

1. **Alat:** spektrofotometer UV-Vis *double beam* (*Thermo Scientific Genesis 10S*), oven (*memmert UN160*), *Rotary evaporator*, *moisture balance*, grinder, ayakan 40 mesh, *beaker glass* (*iwaki*), batang pengaduk, botol ekstrak (*vial*),

gelas ukur (*iwaki*), chamber KLT, erlenmeyer (*iwaki*), labu takar (*iwaki*), pipet tetes, mikropipet (*socorex*), pipet volume (*Pyrex Iwaki*), kaca arloji, pipa kapiler, pipet ukur (*Pyrex Iwaki*), propipet, spatula, sendok kaca, timbangan analitik (*ohaus*), toples kaca, tabung reaksi (*Pyrex Iwaki*).

2. **Bahan:** simplisia daun kupu-kupu, asam galat, metanol p.a, etanol 70% (teknis), etanol 96% (teknis), akuades, standar kuersetin, HCL pekat, kuersetin, asam asetat, plat silika gel 60 F₂₅₄, FeCl₃, AlCl₃, natrium karbonat, reagen *Follin-Ciocalteu*, pereaksi *Wagner*, toluene, aseton, asam format, pereaksi *Dragendroff*, pereaksi *Mayer*, kertas saring, bluetip, *whitetip*, *yellowtip*.

G. Pelaksanaan Penelitian

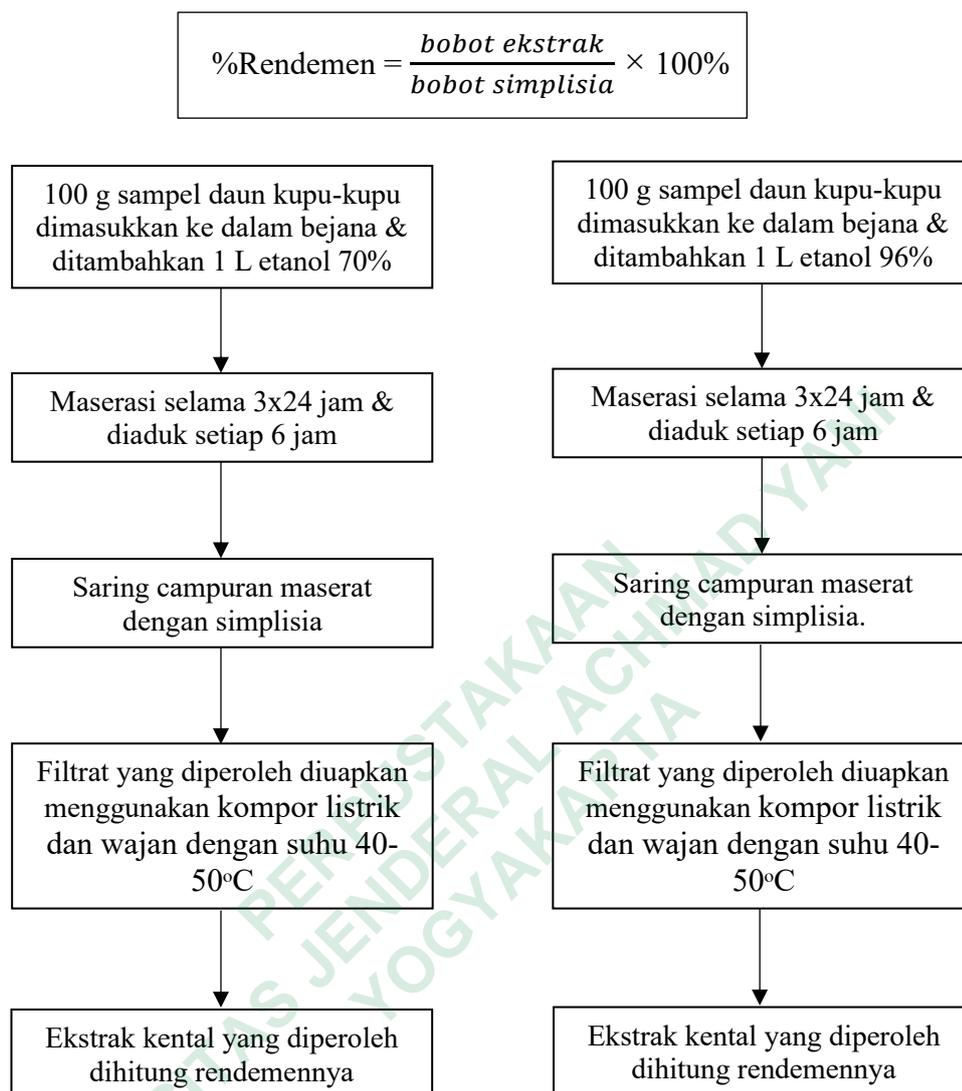
1. Persiapan Sampel

Sortasi basah daun kupu-kupu dengan dicuci menggunakan air mengalir secara hati-hati supaya tidak merusak daunnya. Selanjutnya, daun dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C sampai 50°C sampai benar-benar kering, yang dapat dikenali dari keadaan daun yang mudah hancur ketika diremas dan kadar air <10%. Setelah itu, ditimbang dan dibuat serbuk menggunakan grinder lalu disamakan ukurannya dengan ayakan mesh 40 (Purwasari, 2021).

2. Ekstraksi Sampel

Metode yang digunakan berdasarkan penelitian Aryantini (2021) dan Badra (2017) dengan beberapa modifikasi.

Serbuk daun kupu-kupu diekstraksi secara maserasi, dimana serbuk simplisia dan pelarut dicampur dengan perbandingan 1:10. Siapkan dua toples kaca dengan masing-masing berisi 100 gram serbuk simplisi. Kemudian masukkan masing-masing 1 liter pelarut ke dalam toples kaca dan diaduk sampai homogen. Lalu ditutup dengan rapat dan di maserasi selama 3 hari disimpan ditempat terlindung dari cahaya dengan melakukan pengadukan setiap interval 6 jam. Filtrat yang didapatkan dikentalkan menggunakan kompor listrik dan wajan dengan suhu 40-50°C. Ekstrak kental yang dihasilkan dihitung rendemennya menggunakan rumus:



Gambar 5. Ekstraksi Daun-Kupu-Kupu

Setelah itu dilakukan pengujian organoleptik dengan pancaindra untuk mengetahui kualitas suatu ekstrak yang meliputi bentuk, rasa, aroma, dan warna.

3. Uji Kadar Air

Ekstrak 1 gram masukkan dalam alat *moisture balance* dan diratakan. Setelah itu, dijalankan alat dan diperoleh data kadar air ekstrak daun kupu-kupu.

4. Uji Penapisan Fitokimia

a. Identifikasi Senyawa Alkaloid

Ekstrak etanol 70% dan etanol 96% sebanyak 10 mg dilarutkan dalam etanol 70% dan etanol 96% sebanyak 2 ml. Kemudian, ambil 1 ml dan dibagi menjadi 3 dalam tabung reaksi untuk dilakukan pengujian dengan reagen *Wagner*, reagen *Mayer*, dan reagen *Dragendroff*. Ditambahkan HCl 2N secukupnya dan reagen 3 tetes pada tiap-tiap tabung reaksi. Uji alkaloid dengan penggunaan pereaksi *Mayer* dianggap positif, ditandai dengan keterdapatannya endapan warna putih. Sedangkan pereaksi *Wagner*, menunjukkan hasil positif ditandai dengan keterdapatannya endapan berwarna coklat, dan untuk pereaksi *Dragendroff*, hasil positif ditandai dengan keterdapatannya endapan dengan warna jingga kecoklatan (Purwasari, 2021).

b. Identifikasi Senyawa Fenolik

Ekstrak etanol 70% dan etanol 96% 10 mg larutkan dalam 2 ml etanol 70% dan 2 mL etanol 96% lalu panaskan. Ambil 1 mL dan ditetesi 3 tetes FeCl_3 5%. Membentuk warna hijau atau hijau kebiruan mengandung senyawa fenolik (Harborne, 1987).

c. Identifikasi Senyawa Flavonoid

Ekstrak etanol 70% dan etanol 96% 10 mg larutkan dalam 2 ml etanol 70% dan 2 mL etanol 96% lalu panaskan. Di ambil 1 ml lalu ditambah serbuk magnesium secukupnya dan ditetesi HCl pekat 3 tetes. Membentuk warna kuning, merah, atau jingga, hal ini menandakan adanya hasil positif yang menunjukkan adanya kandungan flavonoid (Harborne, 1987).

d. Identifikasi Senyawa Saponin

Ekstrak etanol 70% dan etanol 96% 10 mg larutkan dalam 2 ml etanol 70% dan 2 mL etanol 96%. Tambahkan 2 mL air panas dan 3 tetes HCl 2 N. Kocok campuran selama 10 detik hingga terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama 10 menit (Harborne, 1987).

5. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Penjenuhan *chamber*

Penjenuhan *chamber* dilakukan dengan menggunakan kertas saring berukuran 18 cm sampai 20 cm. Di campur asam format:aseton:toluen (2:4:4, v/v/v) dalam *chamber* sebagai fase gerak lalu masukkan kertas saring dengan tinggi 18 cm hingga terendam dalam *chamber*. Tutup *Chamber* dengan rapat dan tunggu kertas sampai terbasahi oleh fase gerak yang menunjukkan bahwa *chamber* sudah jenuh (Purwasari, 2021).

b. Pembuatan larutan uji

Dilartukan ekstrak etanol 10 mg dalam 2 mL metanol dan didapatkan konsentrasi 5000 ppm. Uji KLT digunakan kuersetin sebagai pembandingan (Purwasari, 2021).

c. Prosedur KLT

Plat KLT berukuran 10 cm × 2 cm diberi totolan ekstrak dan standar kuersetin (2 µL) menggunakan pipa kapiler. Lalu, masukkan plat ke dalam *chamber* dan ditutup rapat, tunggu hingga eluen terelusi (±20 menit). Di keluarkan plat dari *chamber* dan dikering-anginkan dalam suhu ruang selama 10 menit. Noda yang terbentuk dilihat pada UV 254 nm dan 365 nm. Lalu, semprot menggunakan AlCl₃ 5% pada plat KLT dan diamati kembali dan dihitung R_f (*Retardation Factor*) yang didapatkan (Purwasari, 2021).

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh analit}}{\text{Jarak tempuh pelarut}}$$

6. Penetapan Kadar Fenolik Total

Penetapan kadar fenolik total mengacu pada prosedur Chun *et al* ., (2003).

a. Pembuatan Larutan Baku Standar Asam Galat

Larutkan 10 mg dalam metanol p.a ad 10 mL, didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dilakukan pembuatan seri kadar 100,

150, 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm lalu cukupkan menggunakan metanol *p.a* ad 5 ml.

b. Pembuatan Larutan Natrium Karbonat (Na_2CO_3) 7%

Sebanyak 7 gram Na_2CO_3 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

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Pipet 0,1 ml tiap konsentrasi dari baku standar asam galat, tambahkan 0,1 mL reagen Follin-Ciocalteu, 1 mL Na_2CO_3 7% dan tambahkan WFI ad 5 ml. Dibaca absorbansi pada panjang gelombang 600 nm sampai 800 nm.

d. Penentuan *Operating Time* (OT)

Masukkan 0,1 mL larutan asam galat bersama dengan larutan Na_2CO_3 7% 1 ml, reagen *Follin-Ciocalteu* 0,1 ml dan WFI sampai volume 5 mL. *Scanning* pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan dengan jarak 1 menit hingga menghasilkan reaksi stabil.

e. Pembuatan Kurva Baku Standar Asam Galat

Pereaksi *Follin-Ciocalteu* 0,1 mL dicampur dengan larutan baku standar asam galat pada setiap konsentrasi dan dikocok. Setelah 4 menit, larutan Na_2CO_3 7% sebanyak 0,1 ml ditambahkan dan dikocok lalu ad WFI hingga mencapai 5 mL. Inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang lalu dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum dan diulangi 3 kali.

f. Penentuan Kadar Total Fenolik

Ditimbang seksama 100 mg ekstrak etanol 70% ad metanol *p.a* 10 ml (konsentrasi 10.000 ppm) dan 150 mg ekstrak etanol 96% daun kupu-kupu ad metanol *p.a* 10 ml (konsentrasi 15.000 ppm). Lalu diambil 0,1 mL, tambahkan pereaksi *Follin-Ciocalteu* 0,1 mL dan dikocok. Setelah itu, tunggu dalam waktu 4 menit. Di tambahkan natrium karbonat 7% 1 ml dan WFI hingga volume 5 mL, dikocok sampai merata. Diamkan pada suhu kamar selama OT. Di baca absorbansi pada panjang gelombang maksimum

dan diulangi 3x. TPC (*Total Phenolic Content*) dinyatakan dalam milligram setara asam galat (GAE) per 100 gram sampel. Kadar fenolik ditentukan dengan rumus:

$$\text{TPC} = \frac{\text{C.V.fp}}{\text{g}}$$

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)

7. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Penetapan kadar flavonoid berdasarkan Chang *et al.*, (2002) dalam Ahmad *et al.*, (2014).

a. Pembuatan Larutan Baku Standar Kuersetin

Timbang 10 mg kuersetin, lalu ad 10 mL metanol p.a untuk mendapatkan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, buat larutan seri konsentrasi 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm. Ukur absorbansi masing-masing larutan pada panjang gelombang maksimum.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Di ambil larutan stok kuersetin 1 ml, campur dengan 8 ml CH₃COOH 5% dan 1 mL AlCl₃ 10% Di baca asorbansinya pada rentang panjang gelombang 350 sampai 450 nm.

c. Penentuan *Operating Time* (OT)

Tambahkan AlCl₃ 10% 1 ml dan CH₃COOH 5% 8 ml ke dalam larutan stok kuersetin 1 ml. *Scanning* absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan dengan jarak 1 menit hingga menghasilkan reaksi yang konsisten.

d. Pembuatan Kurva Baku Standar Kuersetin

Pipet 1 mL tiap konsentrasi dalam larutan stok kuersetin kemudian, campur 1 mL AlCl_3 10%, 8 ml CH_3COOH 5% dan tambahkan metanol p.a ad 10 mL. Diamkan sesuai OT pada suhu ruang. Baca absorbansi pada panjang gelombang maksimum dan diulangi 3x.

e. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Timbang dengan seksama 100 mg ekstrak etanol 70% dan larutkan dalam metanol p.a ad 10 mL untuk mendapatkan konsentrasi 10.000 ppm dan 70 mg ekstrak etanol 96% larutkan dalam metanol p.a ad 10 mL untuk mendapatkan konsentrasi 7000 ppm. Masukkan 1 mL dari setiap ekstrak ke dalam labu ukur, tambahkan 8 mL CH_3COOH 5%, 1 mL AlCl_3 10%, dan metanol p.a hingga mencapai volume 10 mL. Kocok campuran hingga homogen dan inkubasi pada suhu ruang. Dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang sudah didapatkan dan ulangi pengukuran sebanyak tiga kali. Rumus perhitungan kadar flavonoid:

$$\text{TFC} = \frac{C \cdot V \cdot fp}{g}$$

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

Dengan menggunakan persamaan regresi linier, dimana absorbansi adalah variable y dan konsentrasi larutan adalah variable x untuk menentukan kadar fenolik dan flavonoid daun kupu-kupu dengan persamaan:

$$y = bx + a$$

Keterangan:

y = absorbansi

a = intersep

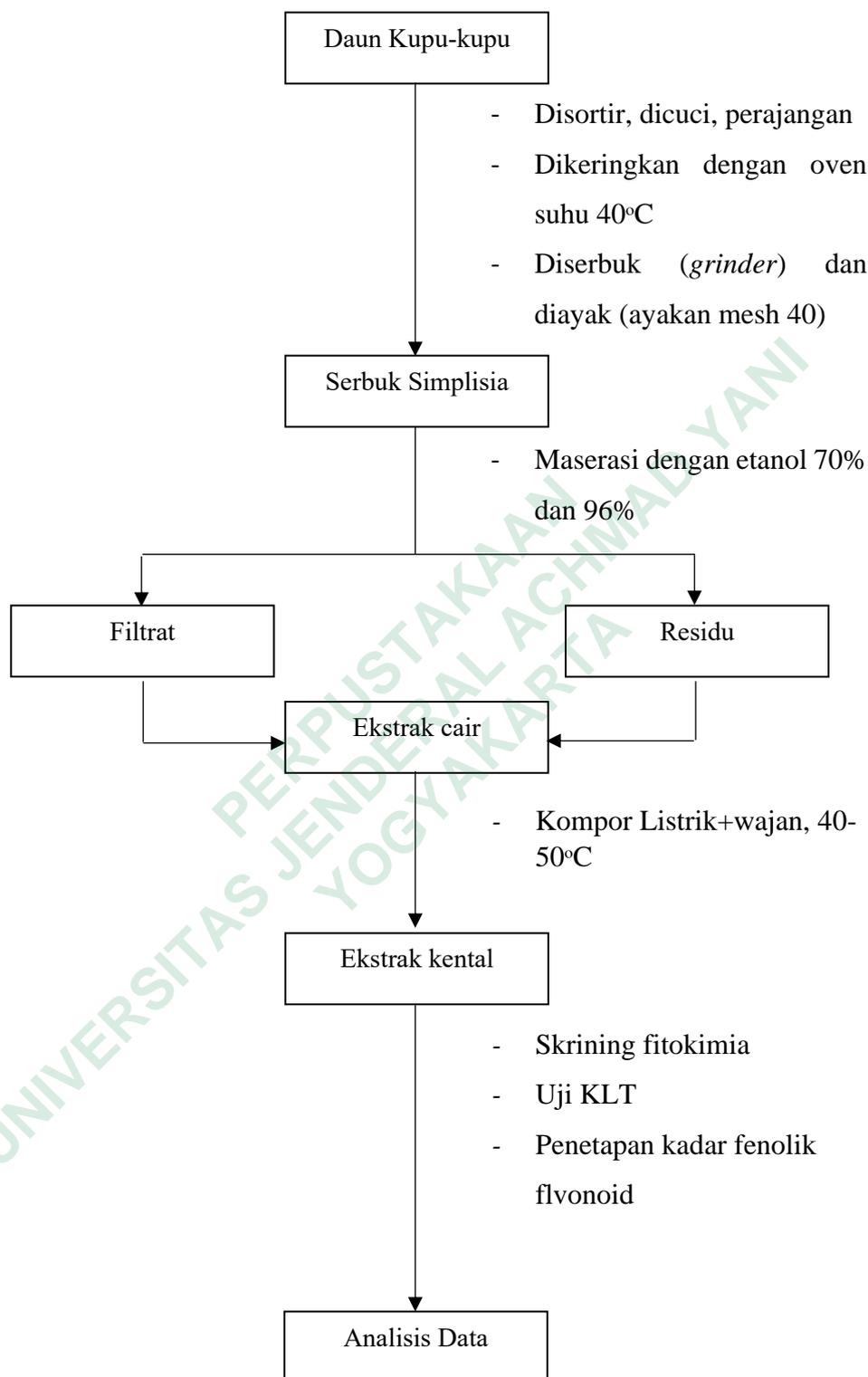
x = konsentrasi/kadar senyawa

b = slope (kemiringan)

2. Analisis Data

Pengolahan data secara statistik menggunakan SPSS. Langkah-langkah uji SPSS sebagai berikut:

- a. Dilakukan uji normalitas Shapiro-Wilk karena sampel yang digunakan kurang dari 50. Uji homogenitas Levene's untuk memastikan bahwa dua atau lebih kelompok sampel data memiliki varians yang serupa. Uji ini memastikan bahwa variasi dalam setiap kelompok sampel tidak berbeda secara signifikan satu sama lain.
- b. Jika memenuhi syarat normalitas dan homogen dilakukan uji *T Independent*. Jika kedua syarat tersebut tidak terpenuhi, maka analisis dilanjutkan dengan uji non-parametrik yaitu Mann-Whitney untuk menentukan apakah terdapat perbedaan signifikan antara kadar fenolik dan flavonoid yang diekstraksi dengan pelarut etanol 70% dan etanol 96%. Jika nilai signifikansinya lebih besar dari 0,05 ($\alpha=5\%$), berarti tidak ada perbedaan signifikan dalam hasil sampel antara kedua pelarut yang digunakan.



Gambar 6. Alur Penelitian