

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara kuantitatif dengan desain eksperimental. Daun binahong diekstraksi dengan perbedaan rasio pelarut serta perbedaan waktu ekstraksi. Metode ekstraksi UAE merupakan metode yang akan digunakan dalam penelitian ini. Hasil yang diperoleh ialah berupa filtrat, yang kemudian diuapkan pada suhu 40°C sampai menjadi ekstrak kental. Ekstrak kental tersebut dilanjutkan dengan analisis kadar dengan standar yang digunakan yaitu kuersetin. Kadar senyawa flavonoid diukur dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Prodi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Mei sampai Juli tahun 2024.

C. Populasi dan Sampel

Sampel dalam penelitian ini yaitu daun binahong (*Anredera cordifolia*) yang didapatkan dari Jl. Monggang, RT 37, Monggang, Pendowoharjo, Sewon, Bantul, Yogyakarta dengan teknik pengambilan *random sampling*. Kriteria daun untuk sampel yaitu daun yang berwarna hijau, segar, berukuran cukup besar, yang dipetik pada pagi hari sekitar pukul 06.00-07.00 pagi.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variasi rasio pelarut etanol 70% dan variasi waktu ekstraksi dari ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*).

2. Variabel terikat

Nilai % rendemen, nilai Rf dan kadar flavonoid total dari ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*).

3. Variabel terkontrol

Waktu pengambilan sampel, pemilihan kriteria daun, suhu pengeringan, serta suhu ekstraksi

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*) merupakan suatu cairan kental yang diperoleh dari simplisia daun binahong dengan proses ekstraksi.
2. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) menggunakan pelarut etanol 70%.
3. Rasio pelarut adalah perbandingan massa atau volume bahan yang akan diekstrak menggunakan pelarut. Pada penelitian ini menggunakan rasio pelarut 1:5, 1:10, 1:15.
4. Waktu ekstraksi ialah periode yang dibutuhkan dalam proses ekstraksi. Dalam penelitian yang akan dilakukan menggunakan waktu 10, 20, 30 menit.
5. Kuersetin ialah senyawa pembanding yang digunakan dalam uji penetapan kadar senyawa flavonoid.
6. Flavonoid total merupakan jumlah dari kandungan total senyawa flavonoid yang ada pada ekstrak dengan pengukuran serapan pada panjang gelombang (λ) maksimum.
7. Metode spektrofotometri UV-Vis merupakan metode pengukuran serapan yang akan digunakan.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Ayakan 40 mesh, cawan petri, cawan porselen, *chamber* KLT (camag), corong kaca (*Herma*), gelas beaker (*iwaki*), gelas ukur (*iwaki*), *grinder* simplisia (*Fomac*), *hotplate*, kaca arloji, labu takar (*iwaki*), mikropipet (Ohaus), oven listrik (*memmert*), penggaris, penjepit kayu, pensil, pipet tetes, pipet ukur (*iwaki*), propipet, rak tabung reaksi, sendok tanduk, sonikator (*Cole Parmer Waterbath Sonicator*), spatula, spektrofotometri UV-Vis (Genesys 10S UV-Vis *Spectrophotometer*), tabung reaksi (*iwaki*), timbangan analitik (*ohaus*), UV *Viewing Cabinet* (Lokal), *waterbath* (*memmert*).

2. Bahan

AlCl_3 , amoniak, aquadest (teknis), CH_3COOH glasial (*p.a*), H_2SO_4 pekat, *bluetip*, daun binahong (*Anredera cordifolia*), etanol 70% (teknis), etanol (*p.a*), FeCl_3 , HCl pekat (*p.a*), kertas Whatman no. 1, kuersetin, kloroform, n-butanol, n-heksan, pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, plat KLT 60 F₂₅₄ (Merck PA), serbuk Mg, *whitetip*.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan sebelum penelitian berlangsung. Determinasi daun binahong dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi bertujuan untuk mengetahui tanaman yang diteliti yaitu tanaman binahong asli, proses determinasi yaitu dengan membandingkan sampel tanaman dengan tanaman lain yang telah diketahui sebelumnya dengan pencocokkan (Utami et al., 2023).

2. Persiapan sampel

Daun binahong dicuci bersih dengan air mengalir, lalu ditiriskan dan dirajang. Hasil rajangan dikering-anginkankan kemudian dilakukan sortasi kering. Proses pengeringan dilakukan dalam oven selama 3 hari dengan suhu 50°C. Sampel yang telah mengering, selanjutnya dilakukan penyerbukkan dengan bantuan *grinder*. Serbuk dari hasil *grinder* lalu diayak dengan ayakan berukuran 40 mesh hingga didapatkan serbuk yang lebih halus (Helmidanora et al., 2020).

3. Desain faktorial

Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang digunakan dalam penelitian ini terbagi menjadi dua faktor yaitu rasio pelarut dan waktu ekstraksi. Perbandingan sampel dengan rasio pelarut terdiri dari 1:5, 1:10, 1:15, sedangkan waktu ekstraksi terdiri dari 10, 20, 30 menit. Setiap rancangan penelitian direplikasi dengan 3 kali percobaan. Sehingga percobaan berjumlah 27 kali, yang mana RAK dapat terlihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Rancangan Acak Kelompok (RAK)

Rasio Pelarut	Waktu ekstraksi (menit)		
1:5	10	20	30
1:10	10	20	30
1:15	10	20	30

Keterangan: **1:5** (10 g simplisia : 50 mL pelarut), **1:10** (10 g simplisia : 100 mL pelarut), **1:15** (10 g simplisia : 150 mL pelarut)

4. Pembuatan ekstrak daun binahong

Ditimbang sebanyak 10 g serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia*) ditambahkan etanol 70% sebagai pelarut dengan variasi rasio bahan : pelarut yaitu 1:5 (10 g : 50 mL) , 1:10 (10 g : 100 mL), 1:15 (10 g : 150 mL). Diekstraksi menggunakan *ultrasonic bath* berfrekuensi 40 kHz (Sjahid et al., 2020) dalam waktu 10, 20, 30 menit dengan 3 kali replikasi. Pemisahan filtrat dan residu hasil ekstraksi dilakukan dengan penyaringan menggunakan kertas saring. Filtratnya diuapkan pada suhu 40°C (Yuliantari et al., 2017) menggunakan *waterbath* sampai didapatkan ekstrak yang kental.

5. Kontrol kualitas ekstrak

a. Perhitungan rendemen

Rendemen ialah perbandingan antara berat dari suatu ekstrak kental yang dihasilkan dan berat dari simplisia yang digunakan. Suatu rendemen berkaitan dengan kuantitas senyawa bioaktif yang dimiliki suatu tanaman (Dewatisari et al., 2018). Menurut Badriyah & Fariyah (2023) untuk memperoleh nilai rendemen dari suatu ekstrak, cawan kosong ditimbang bobotnya terlebih dahulu kemudian dimasukkan sejumlah ekstrak kental yang didapatkan. Diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu 40°C hingga bobotnya tetap. Bobot ekstrak dalam cawan sesudah penguapan dikurangkan dengan bobot dari cawan kosong. Rumus rendemen ekstrak (%b/b) dapat dihitung menggunakan persamaan (1).

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (g)}}{\text{Berat simplisia (g)}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

b. Uji organoleptik

Uji organoleptik yaitu pengamatan fisik yang dilakukan dengan indra penglihat (mata) secara langsung dari suatu bahan yang diuji seperti dari bentuk, warna, aroma, dan rasa (Hita et al., 2020).

6. Uji penapisan fitokimia

a. Identifikasi alkaloid

Ekstrak 100 mg ditambahkan kloroform sebanyak 2 mL dan amoniak sebanyak 2 mL. Larutan disaring lalu filtratnya ditambahkan dengan 5 tetes H_2SO_4 lalu digojog dan dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan. Sebanyak 0,5 mL lapisan atas dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi berbeda. Masukkan reagen Dragendroff 3 tetes pada tabung pertama, sebanyak 3 tetes reagen Mayer untuk tabung selanjutnya dan 3 tetes reagen Wagner pada tabung terakhir. Dikatakan positif alkaloid jika dibuktikan dengan membentuk endapan merah atau jingga oleh penambahan reagen Dragendroff. Apabila dengan penambahan reagen Mayer terdapat endapan putih kekuningan menandakan hasil yang positif, sedangkan dengan penambahan reagen Wagner hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna coklat (Mamahit et al., 2023).

b. Identifikasi flavonoid

Ditimbang 100 mg ekstrak masukkan dalam tabung reaksi. Tambahkan etanol 70% sebanyak 3 mL lalu dikocok hingga homogen. Larutan tersebut disaring kemudian filtratnya ditambahkan 100 mg serbuk magnesium dan HCl pekat sebanyak 5 tetes. Apabila terjadi perubahan warna menjadi kuning, jingga sampai merah menandakan positif flavonoid (Maharani et al., 2022).

c. Identifikasi saponin

Dimasukkan 100 mg ekstrak ke dalam tabung reaksi. Tambahkan air panas sebanyak 2 mL lalu digojog dengan waktu 1 menit. Hasil positif saponin jika adanya buih atau busa yang tetap dan stabil ± 7 menit (Surya et al., 2022).

d. Identifikasi fenolik

Sebanyak 100 mg ekstrak ditambahkan 2 mL FeCl_3 5% lalu amati adanya perubahan warna. Positif fenolik ditandai oleh perubahan warna menjadi hijau (Badaring et al., 2020).

e. Identifikasi triterpenoid dan steroid

Masukkan 100 mg ekstrak ke dalam tabung reaksi dan larutkan menggunakan dengan n-heksan sampai 5 mL. 1 mL larutan ditambahkan dengan CH_3COOH glasial 1 mL dan H_2SO_4 pekat sebanyak 1 mL. Terbentuknya cincin coklat kemerahan menandakan positif triterpenoid sedangkan apabila terbentuk cincin hijau atau biru artinya positif steroid (Fajriaty et al., 2018).

7. Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Pembuatan fase gerak dan penjenjuran *chamber*

Fase gerak pada penelitian ini terbentuk dari campuran n- butanol : asam asetat : air (4:1:5). Ketiga bahan tersebut dicampur kedalam *chamber* sebanyak 10 mL (Noviyanty et al., 2022). Tempatkan kertas saring ke dalam *chamber*. *Chamber* ditutup kedap dan biarkan sampai jenuh selama 24 jam dengan tanda seluruh kertas saring sudah terbasahi (Firdaus, 2016).

b. Pembuatan larutan ekstrak dan pembanding

Ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*) dalam rasio pelarut 1:5, 1:10, 1:15 selama 10, 20, 30 menit dibuat menjadi konsentrasi 1%. Ditimbang masing-masing 50 mg ekstrak lalu dicampur etanol *p.a* hingga 5 mL. Larutan pembanding terbuat dalam konsentrasi 0,5% dengan cara ditimbang 25 mg kuersetin lalu tambahkan etanol *p.a* sebanyak 5 mL (Ratu et al., 2019).

c. Identifikasi senyawa dengan uji KLT

Plat KLT F₂₅₄ berukuran 6 x 10 cm dimasukkan ke dalam oven untuk dipanaskan selama 30 menit dengan suhu 110°C. Bagian atas dan bagian bawah plat KLT diberi tanda masing-masing 1 cm dengan pensil. Ditotolkan larutan standar kuersetin dan larutan ekstrak daun binahong menggunakan *whitetip* tepat di tanda garis. Dimasukkan plat KLT F₂₅₄

pada *chamber* yang telah jenuh lalu dielusi sampai batas elusi 8 cm dari tolotan awal. Plat KLT F₂₅₄ yang sudah terelusi dikeringkan lalu diamati menggunakan sinar UV dalam λ 254 dan 365 nm (Karimatulhadj, 2020). Plat KLT F₂₅₄ disemprotkan dengan pereaksi AlCl₃ 5% sebagai penampak bercak. Positif mengandung flavonoid apabila pada plat KLT menimbulkan bercak berwarna kuning intensif (Asmorowati & Lindawati, 2019). Setelah didapat noda yang diinginkan, selanjutnya yaitu menghitung nilai Rf (*Retardation Factor*).

8. Penetapan kadar flavonoid total

Pembuatan larutan standar kuersetin didasarkan pada penelitian Asmorowati & Lindawati (2019) dengan sedikit modifikasi.

a. Pembuatan larutan standar kuersetin

1) Pembuatan larutan baku induk kuersetin 1000 ppm

Ditimbang serbuk kuersetin sebanyak 10 mg lalu masukkan ke dalam labu takar 10 mL. Larutkan menggunakan etanol *p.a* sampai 10 mL atau sampai tanda batas hingga diperoleh konsentrasi larutan 1000 ppm.

2) Penetapan λ maksimum standar kuersetin 100 ppm

Dari larutan kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 0,5 mL, tambahkan 0,5 mL AlCl₃ 10% dan CH₃COOH 5% sebanyak 4 mL. Pembacaan serapan optimum dilakukan pada λ 415 nm. Dikatakan sebagai λ maksimum apabila dapat memberikan hasil serapan paling maksimum (Yudhantara & Rohmawati, 2022).

3) Penetapan *operating time* (OT)

OT dilakukan guna mengetahui waktu pengukuran dari suatu senyawa pada saat pembacaan serapan yang paling stabil (Suharyanto & Prima, 2020). Penetapan OT dilakukan dengan memipet 0,5 mL larutan kuersetin 100 ppm lalu tambahkan AlCl₃ 10% sebanyak 0,5 mL dan CH₃COOH 5% sebanyak 4 mL. Larutan tersebut diukur pada λ maksimum dengan interval waktu setiap 1 menit selama 60 menit (Werdiningsih et al., 2022). OT dilakukan pada menit ke-39.

4) Pembuatan kurva baku kuersetin

Sebanyak 400, 600, 800, 1000 dan 1200 μL larutan kuersetin dimasukkan dalam labu takar 10 mL lalu di *ad* sampai tanda batas dengan etanol *p.a.* Didapatkan konsentrasi 40, 60, 80, 100 dan 120 ppm. Setiap seri konsentrasi dipipet 0,5 mL lalu tambahkan 0,5 mL AlCl_3 10% dan 4 mL CH_3COOH 5%. Dilakukan inkubasi selama 39 menit dan dibaca serapan absorbansinya pada λ 415 nm.

b. Pembuatan larutan uji ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*)

Pembuatan larutan stok ekstrak dan larutan uji ekstrak didasarkan pada penelitian Asmorowati & Lindawati (2019) dengan sedikit modifikasi.

1) Pembuatan larutan stok ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*)

Dimasukkan 20 mg ekstrak dari masing-masing variasi rasio pelarut dan waktu ekstraksi pada labu takar 10 mL. Di *ad* sampai batas dengan etanol *p.a* hingga didapatkan konsentrasi 2000 ppm.

2) Pembuatan larutan uji ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*)

Dipipet 0,5 mL dari larutan stok ekstrak lalu tambahkan AlCl_3 10% sebanyak 0,5 mL dan CH_3COOH 5% sebanyak 4 mL. Larutan diinkubasi dalam waktu 39 menit lalu dibaca serapannya pada λ 415 nm dengan bantuan spektrofotometer UV-Vis. Dilanjutkan dengan perhitungan kadar flavonoid total dari masing-masing variasi.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penentuan R_f hasil KLT

Nilai R_f (*Retention Factor*) merupakan perbandingan antara jarak tempuh senyawa atau sampel dibagi dengan jarak tempuh pelarut. Nilai maksimal R_f yaitu 1 dan nilai minimal dari R_f ialah 0 (Darmawansyah et al., 2023). Rentang nilai R_f yang menunjukkan adanya kandungan flavonoid yaitu antara 0,2-0,8 (Husna & Mita, 2020). Nilai R_f dihitung menggunakan rumus berikut :

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

2. Penetapan kadar flavonoid total

Penetapan kadar flavonoid dilakukan melalui kurva baku standar yang dibuat menggunakan kuersetin dengan berbagai konsentrasi yang diukur dengan bantuan spektrofotometri UV-Vis. Nilai absorbansi dari kurva baku yang diperoleh digunakan untuk melakukan regresi linear dengan cara konsentrasi vs nilai absorbansi menggunakan persamaan berikut :

$$Y = bx + a$$

Persamaan yang didapat akan digunakan sebagai pembanding untuk menetapkan kadar total senyawa flavonoid dalam sampel (Januarti et al., 2017). Perhitungan kadar flavonoid total dilakukan dengan rumus berikut :

$$TFC = \frac{C \times V \times Fp}{m}$$

Keterangan :

TFC = Total Flavonoid Content (mg QE/g)

C = Kesetaraan kadar standar kuersetin (mg/L)

V = Volume total ekstrak etanol (L)

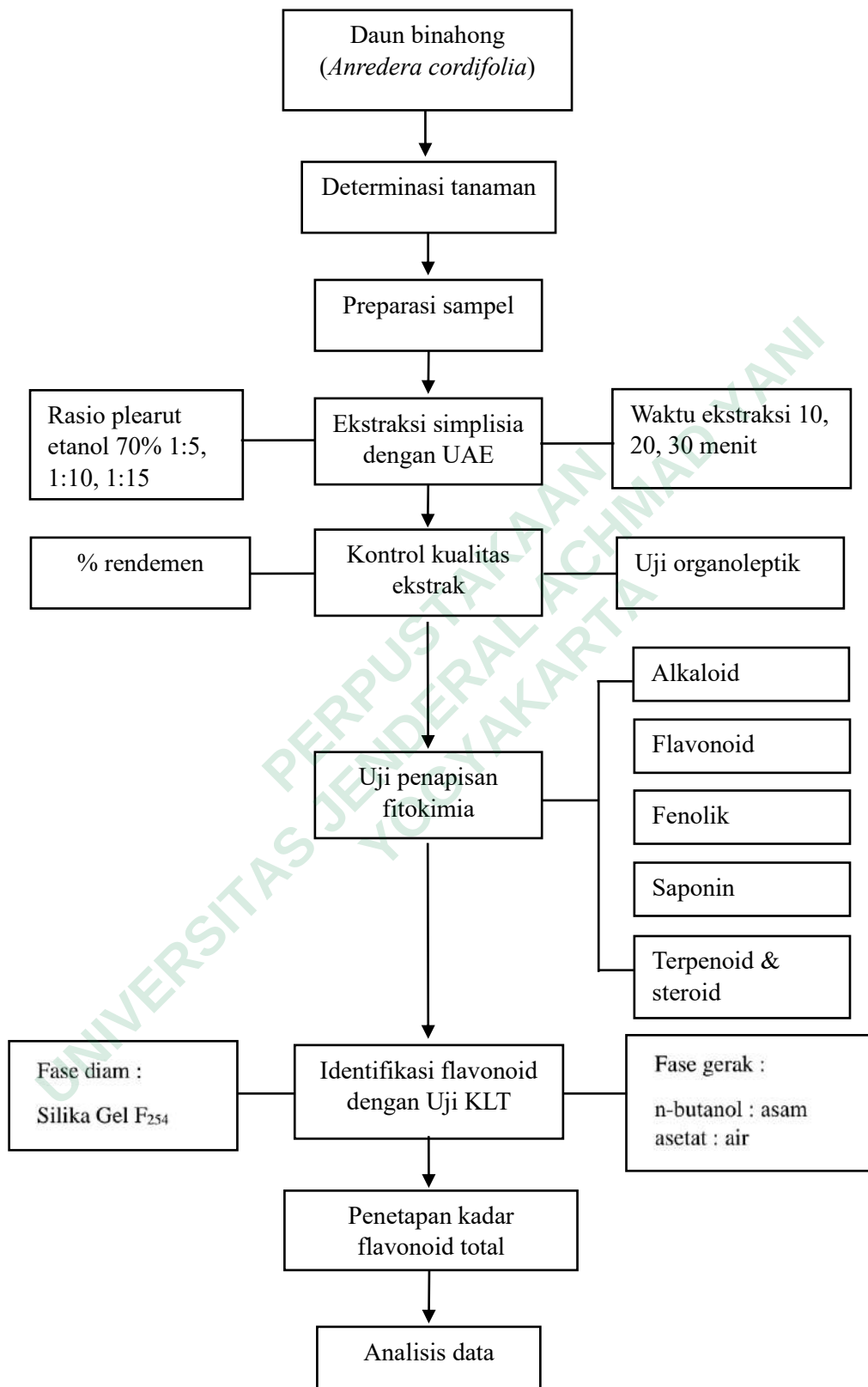
Fp = Faktor pengenceran

M = Berat sampel (g)

(Firnando et al., 2019).

3. Analisis data statistik

Hasil data seluruhnya akan dianalisis secara statistik menggunakan SPSS. Hasil data kadar flavonoid total dengan variasi rasio pelarut (1:5, 1:10, 1:15) dan waktu ekstraksi (10, 20, 30 menit) dapat dilihat distribusinya melalui uji normalitas (*Shapiro-wilk*) dan uji homogenitas (*Levene Statistic*). Data yang terdistribusi secara normal serta homogen, dapat dilihat dari nilai $p > 0,05$ (H_0 diterima), dan dilanjutkan dengan uji non parametrik. Uji non parametrik yang digunakan adalah *Kruskal Wallis* dimana langkah alternatif untuk uji *One Way Anova* ketika diketahui data yang dihasilkan tidak terdistribusi secara normal maupun tidak homogen. Dilanjutkan dengan uji *Pairwise Comparisons* untuk mengetahui perbedaan signifikan dari tiap-tiap sampel (Atmaja & Herliansyah, 2021; Januarti et al., 2017).



Gambar 12. Skema Kerja