

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain pada penelitian ini menggunakan desain eksperimental dengan menggunakan jenis pelarut ekstraksi pada sampel daun singkong. Tahapan awal melibatkan penggunaan metode ekstraksi UAE (*Ultrasound Assisted Extraction*) untuk ekstraksi. Dilakukan analisis kualitatif berupa uji fitokimia, sementara analisis kuantitatif dengan metode spektrofotometri UV-Vis. Hasil akhirnya adalah menentukan jenis pelarut ekstraksi yang paling efektif dalam menghasilkan ekstrak dengan kadar flavonoid yang tinggi.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

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

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dari agustus hingga September 2023.

C. Sampel Penelitian

Daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl) yang sudah tua pada tangkai ke 5 sampai terakhir (Azizah *et al.*, 2020). Sampel ini diperoleh dari wilayah Geblakan, Tamantirto, Kasihan, Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta (7°49'9"S dan 110°19'39"E)

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Dalam penelitian ini, variabel bebas terdiri dari pelarut etanol 70% dan metanol.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat terdiri dari % rendemen dan total flavonoid pada ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl).

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali terdiri dari asal tanaman, bagian daun, waktu panen, suhu pengeringan, waktu pengeringan dan suhu UAE.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol 70% daun singkong merupakan suatu cairan kental yang diperoleh dengan merendam serbuk dalam pelarut etanol 70% melalui proses ekstraksi dengan bantuan gelombang ultrasonik kemudian dilakukan proses penguapan.
2. Ekstrak metanol daun singkong cairan kental yang dihasilkan dengan merendam serbuk dalam pelarut metanol melalui proses ekstraksi yang dibantu gelombang ultrasonik, kemudian dilanjutkan dengan proses penguapan.
3. UAE adalah metode ekstraksi non konvensional dengan memanfaatkan energi gelombang ultrasonik yaitu gelombang suara dengan frekuensi diatas pendengaran manusia (≥ 20 kHz).
4. Kadar total flavonoid adalah jumlah keseluruhan flavonoid yang terdapat dalam ekstrak sampel, yang serapannya telah diukur pada panjang gelombang optimum sebagai nilai % b/b EQ (ekuivalen kuersetin)

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Ayakan 40 mesh, botol duran 500 mL, corong Buchner, bejana atau chamber, gelas ukur, gelas beaker, grinder, labu ukur 5 mL(iwaki), mikropipet (Eppendorf), *Moisture balance*, oven listrik (Memmert), penggaris, pensil, penangas air, sonikator (*Cole Parmer Waterbath Sonicator*), timbangan analitik (Ohaus SW version 10S pipet tetes, spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer*), tabung reaksi, vortex.

2. Bahan

Asam asetat 5%, aquadest, alumunium klorida 10%, $AlCl_3$, *blue tip*, Daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl), etanol 70%, etanol (*p.a*), $FeCl_3$,

ekstrak etanol 70% daun singkong dan ekstrak metanol daun singkong, kuersetin (Sigma-aldrich), metanol, gelatin 1%, kertas Whatman no. 1, Liebermann-Burchard, asam asetat glasial, H₂SO₄ pekat, HCL pekat, *white tip*, HCL 2N, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff dan pereaksi Wagner.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Uji determinasi dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Uji ini bertujuan untuk memverifikasi identitas tanaman yang akan diteliti, mencegah kesalahan dalam pengumpulan sampel, dan menghindari kemungkinan pencampuran tanaman dengan spesies lain. Bagian yang digunakan dalam uji ini adalah seluruh bagian tanaman singkong (*Manihot utilissima* Pohl).

2. Preparasi Sampel

Daun singkong yang telah dikumpulkan dicuci pada air mengalir. Di kering anginkan kemudian dikeringkan pada oven suhu 50°C. Simplisia daun singkong yang kering ditandai dengan daun akan hancur ketika diremas, selanjutnya menghaluskan dengan menggunakan grinder dan diayak dengan ayakan berukuran 40 mesh (Sari & Meitisa, 2017).

3. Ekstraksi Sampel

Metode yang digunakan dalam ekstraksi sampel mengacu pada penelitian (Verdiana *et al.*, 2018) dengan beberapa modifikasi. Ekstraksi daun singkong dimulai dengan menimbang serbuk daun singkong sebanyak 45 gram menjadi 15 gram untuk 3 kali percobaan, kemudian larutkan dalam masing masing pelarut (etanol 70% dan metanol) dengan perbandingan 1:10 (berat/volume), sehingga setiap jenis pelarut membutuhkan 150 mL. Di ekstraksi selama 30 menit menggunakan sonikator pada suhu 40°C. Di gunakan kertas saring Whatman No. 1 untuk menyaring larutan. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan penangas air pada suhu 40°C, menghasilkan ekstrak kental dari daun singkong.

4. Kontrol kualitas ekstrak

a. Nilai rendemen

Perhitungan rendemen ekstrak etanol 70% dan metanol dilakukan dengan rumus:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat serbuk simplisia}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

b. Organoleptik Simplisia

Uji organoleptis bertujuan untuk mengetahui secara objektif terhadap ekstrak yang diperoleh dengan menguji tekstur, bau, dan warna.

c. Uji Fitokimia

1) Uji Alkaloid

Ekstrak daun singkong sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam 5 mL etanol dan ditambahkan 5 mL HCl 2N.

a) Pereaksi Mayer: Ambil 2,5 mL larutan dan tambahkan 5 tetes reagen Mayer. Positif mengandung alkaloid, akan terbentuk endapan putih atau kekuningan.

b) Pereaksi Dragendorff: Ambil 2,5 mL larutan dan tambahkan 4 tetes reagen Dragendorff. Positif mengandung alkaloid, akan terbentuk endapan coklat hingga kuning atau jingga.

c) Pereaksi Wagner: Ambil 2,5 mL larutan dan tambahkan 5 tetes reagen Wagner. Positif mengandung alkaloid, akan terbentuk endapan coklat.

Jika 2 dari 3 uji menunjukkan hasil positif maka dapat disimpulkan mengandung alkaloid (Aiyuba *et al.*, 2023).

2) Uji Saponin

Masing-masing ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram, lalu larutkan dalam 10 mL akuades dan aduk secara kuat selama 1 menit. Setelah itu, campuran tersebut dibiarkan 10 menit dan diamati buih atau busa, kemudian ditambahkan 2 mL HCl 2 N, positif mengandung saponin dengan buih yang tetap ada (Aiyuba *et al.*, 2023).

3) Uji Flavonoid

Masing-masing ekstrak ditimbang seberat 0,1 gram kemudian dilarutkan dalam 5 mL etanol (*pa*). Di dalam tabung reaksi, larutan tersebut dipanaskan selama 5 menit. Larutan dicampur dengan 10 tetes larutan HCl pekat dan 0,2 gram serbuk Mg. Indikasi positif adanya senyawa flavonoid ditunjukkan oleh perubahan warna larutan menjadi merah, kuning, atau jingga. (Aiyuba *et al.*, 2023).

4) Uji Tanin

Masing-masing ekstrak dilarutkan sebanyak 0,5 gram kemudian dilarutkan dalam 5 mL etanol (*pa*). Larutan ekstrak kemudian ditambahkan 5 tetes larutan FeCl₃ 5%. Positif mengandung senyawa tanin ditunjukkan oleh terbentuk warna hijau gelap/biru (Aiyuba *et al.*, 2023).

5) Uji Steroid/Terpenoid

Masing-masing ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram dan dilarutkan dalam 5 mL etanol (*pa*) Ditambahkan 3 tetes pereaksi Liebermann-Burchard (asam asetat glasial dan H₂SO₄ pekat). Campuran ini diaduk dan dibiarkan selama beberapa waktu. Positif senyawa triterpenoid akan ditunjukkan oleh perubahan warna larutan menjadi merah atau ungu, sedangkan positif senyawa steroid akan ditunjukkan oleh perubahan warna menjadi biru (Aiyuba *et al.*, 2023).

5. Penetapan Kadar Total Flavonoid

Prosedur percobaan kadar total flavonoid ekstrak daun singkong mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Yani *et al.*, (2023) dengan beberapa modifikasi.

a. Persiapan larutan induk standar kuersetin dengan konsentrasi 1000 ppm

Ditimbang 10 mg standar kuersetin, kemudian dilarutkan dalam etanol *p.a* hingga mencapai volume 10 mL di labu takar dan didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dilakukan pembuatan seri kadar 40, 60,

80, 100, dan 120 ppm dengan menggunakan volume 5 mL dengan etanol *p.a.*

b. Pembuatan AlCl_3 10%

Ditimbang serbuk AlCl_3 1 gram dan dilarutkan dengan aquadest sampai volumenya 10 mL.

c. Pembuatan larutan asam asetat 5%

Dilarutkan asam asetat sebanyak 5 mL kemudian dilarutkan dengan aquadest sampai 100 mL.

d. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ maks) kuersetin

Sebanyak 1 mL kuersetin standar dengan konsentrasi 80 ppm diambil, kemudian dicampur dengan 8 mL larutan asam asetat 5% dan 1 mL AlCl_3 10%. Campuran tersebut kemudian diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis dalam rentang panjang gelombang 400-800 nm. Data yang tercatat mencakup panjang gelombang maksimum yang digunakan untuk mengukur serapan dari sampel ekstrak daun singkong yang dilarutkan dalam etanol 70% dan metanol.

e. Pembuatan *operating time*

Dipipet 1 mL larutan standar kuersetin 80 ppm, kemudian dicampurkan dengan 8 mL asam asetat 5% serta 1 mL AlCl_3 10%. Larutan tersebut diukur nilai absorbansi dengan interval waktu 1 menit dalam 1 jam pada panjang gelombang yang telah ditentukan hingga dicapai kestabilan nilai absorbansi.

f. Pembuatan kurva baku kuersetin

Pipet 1 mL dari setiap konsentrasi dalam seri baku kuersetin, lalu tambahkan 8 mL asam asetat 5% dan 1 mL AlCl_3 10%, lalu biarkan bereaksi selama *operating time*. Nilai absorbansi dapat diukur menggunakan teknik spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan. Perlakuan dilakukan 3 kali replikasi.

g. Pembuatan larutan uji

Ditimbang sebanyak 100 mg dari masing-masing ekstrak etanol 70% dan ekstrak metanol daun singkong dilarutkan dalam etanol *p.a* hingga volumenya mencapai 100 mL, menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1.000 ppm.

h. Penentuan kadar flavonoid total ekstrak daun singkong (*Manihot tilissima* Pohl)

Diambil masing-masing 1 mL ekstrak etanol 70% dan metanol. Selanjutnya, ditambahkan 8 mL asam asetat 5% dan 1 mL larutan $AlCl_3$ 10% ke dalam masing-masing sampel, lalu dibiarkan selama *operating time* yang didapatkan. Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dengan tiga kali pengulangan untuk setiap pelarut pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan..

H. Metode Pengolahan dan Analisa Data

1. Penentuan kadar total flavonoid

Penetapan kadar total flavonoid (TFC) dilakukan melalui metode spektrofotometri dengan penentuan kadar terhitung $y=bx+a$ menggunakan kurva standar yang dibuat dengan kuersetin dari berbagai konsentrasi. Kadar TFC disajikan dalam miligram kuersetin per gram sampel yang dapat disingkat sebagai mgQE/g sampel. Rumus kadar total flavonoid (Dewi *et al.*, 2018) : pada persamaan (2)

$$TFC = \frac{C.V.Fp}{m} \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan :

TFC = Total Flavonoid *Content* (mg QE/gram)

C = Konsentrasi larutan standar kuersetin (mg/L)

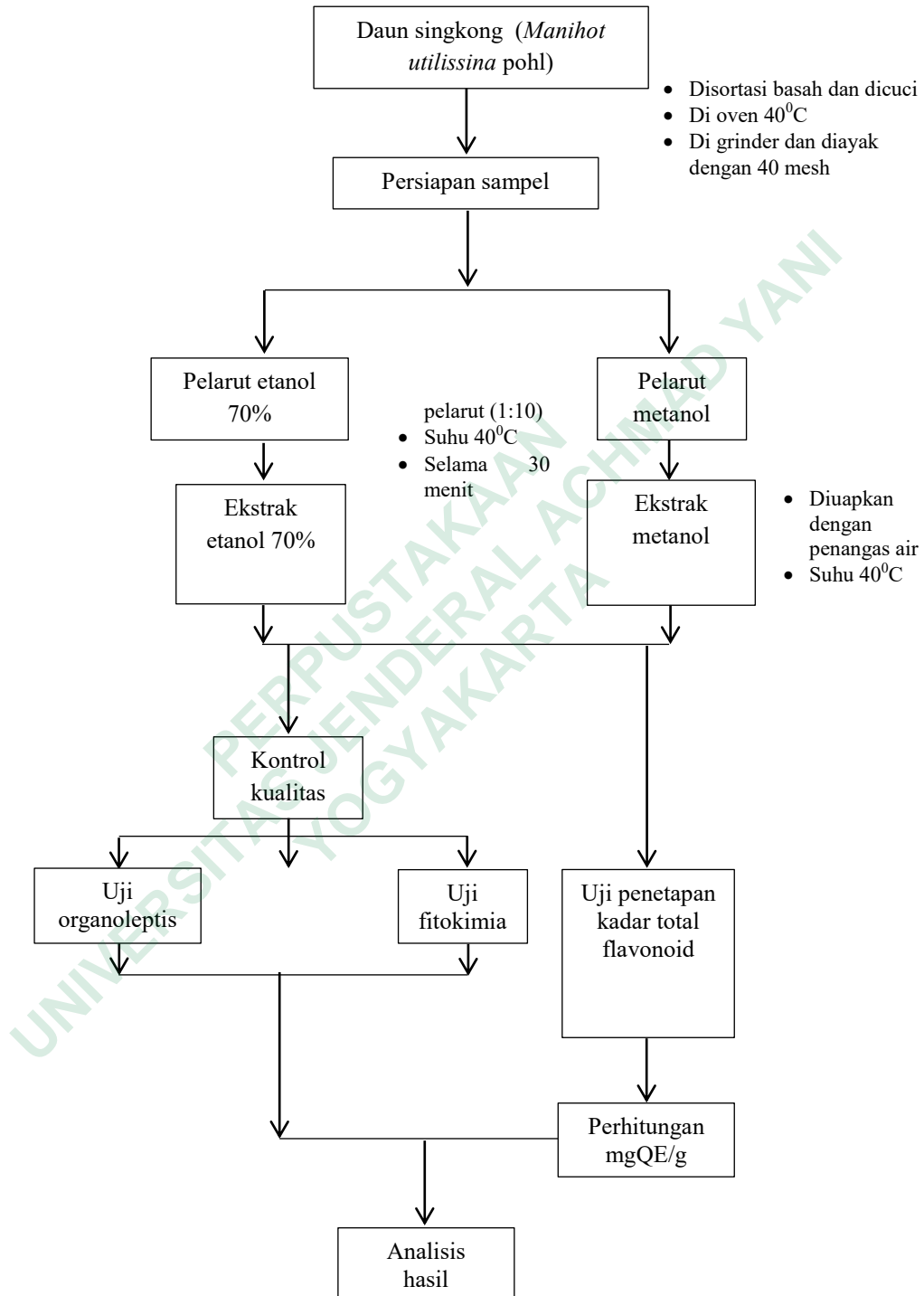
V = Volume sampel yang digunakan (L)

Fp = Faktor pengenceran

m = Massa / berat sampel yang digunakan (g)

2. Analisis statistika

Data yang didapatkan seluruhnya akan di akan dianalisis secara statistik menggunakan SPSS. Sebelumnya, dilakukan uji Levene's atau uji homogenitas untuk menentukan apakah ada perbedaan variasi antara beberapa data dari populasi yang memiliki varian sama atau tidak. Kemudian uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* untuk sampel dengan jumlah yang kecil. Data dari kedua uji tersebut dapat dilihat nilai signifikannya, yaitu $p > 0,05$ dan dilanjutkan dengan pengujian parametrik. Uji parametrik yang digunakan adalah uji T *independent*. Kemudian jika didapatkan hasil data tidak homogen atau terdistribusi normal, maka menggunakan uji non-parametrik yaitu uji *mann whitney* sebagai langkah alternatif untuk uji T *independent*. Syarat uji T *independent* agar signifikan terdapat perbedaan, yaitu ($p < 0,05$). Hal ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pelarut terhadap nilai total flavonoid.



Gambar 10. Skema Pelaksanaan Penelitian