

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menerapkan metode eksperimental secara kualitatif dan analisis kuantitatif. KLT dan skrining fitokimia digunakan untuk identifikasi senyawa secara kualitatif, sedangkan spektrofotometri UV-Vis diterapkan untuk penentuan kadar senyawa secara kuantitatif. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi etanol terhadap kadar flavonoid total ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr).

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian bertempat di Laboratorium Kimia Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Rentang waktu pelaksanaan penelitian ini berlangsung pada Maret sampai Mei 2025.

C. Sampel Penelitian

1. Populasi

Pada penelitian ini sampel di ambil dari kebun Merapi Farma Herbal yang berlokasi di Hargobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta (titik koordinat 7°37'41"S 110°25'33"E).

2. Sampel

Sampel daun sambung nyawa pada penelitian ini diambil dengan kriteria berusia 4 bulan, daun urutan ke 2 hingga ke 5 ke arah pucuk yang dipetik pada pagi hari pada jam 08.00-10.00 (Wijayanti, 2012).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

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

2. Variabel terikat

Kadar total flavonoid yang diekstrak dari daun sambung nyawa merupakan variabel terikat dalam penelitian ini.

3. Variabel terkontrol

Faktor-faktor yang dikendalikan dalam penelitian ini meliputi tempat tumbuh, waktu panen, karakteristik sampel, suhu dan waktu pengeringan, suhu dan waktu ekstraksi, dan suhu pengentalan ekstrak.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak daun sambung nyawa

Ekstrak daun sambung nyawa merupakan ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi UAE menggunakan pelarut etanol dengan variasi konsentrasi, yaitu 70% dan 96%.

2. UAE

UAE merupakan metode ekstraksi non-konvensional yang dapat digunakan untuk ekstraksi daun sambung nyawa dengan hasil berupa ekstrak daun sambung nyawa.

3. Etanol 70%

Etanol 70% merupakan pelarut yang lebih polar dari etanol 96% yang dapat mengekstraksi senyawa flavonoid pada daun sambung nyawa.

4. Etanol 96%

Etanol 96% merupakan pelarut semipolar yang dapat mengekstraksi senyawa senyawa flavonoid pada daun sambung nyawa.

5. Kadar flavonoid total

Kadar flavonoid total dinyatakan dalam satuan mg QE/g sampel (*Quersetin Equivalent* per gram sampel) dengan menggunakan standar baku kuersetin dan diukur pada spektrofotometer UV-Vis.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat gelas (*Iwaki*), Ayakan 40 mesh, cawan porselen, *chamber* KLT (*Camag*), corong, grinder (*Fomac*), labu ukur, mikropipet (*Eppendorf*), *moisture analyzer* (*Ohaus* MB-120), oven listrik (*Memmert*), penangas air, pipet ukur, pipet tetes, detektor UV 254 nm dan 365 nm, spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer*), termometer, timbangan analitik mikro (*Ohaus* PAJ1003), timbangan analitik semimikro (*Ohaus* PAJ1003) timbangan semi mikro (*Ohaus*), *Ultrasonic bath* (*Cole Palmer Waterbath Sonicator*), dan *waterbath*.

2. Bahan

Akuades, AlCl₃ (Sigma), asam asetat (Merck), *blue tip* (*biologic*), CH₃COOH (*p.a*), CH₃COOK *p.a* (Merck), daun sambung nyawa, FeCl₃ 1% (*p.a*), etanol *p.a* (merck), fase gerak n-Heksan *p.a* (Merck), n-butanol (M), etil asetat *p.a* (Merck), asam format *p.a* (Merck), H₂SO₄ *p.a* (Merck), HCl *p.a* (Merck), kain saring, kertas whatman no.1, kuersetin standar *p.a* (Sigma), magnesium (Merck), metanol *p.a* (Merck), n-butanol *p.a* (Merck), pelarut etanol 70% (teknis), pelarut etanol 96% (teknis), pipa kapiler mikroliter, reagen wagner (teknis), reagen dragendorff (teknis), reagen mayer (teknis), silika gel F₂₅₄ (*p.a*).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi daun sambung nyawa bertujuan untuk memastikan keaslian daun sambung nyawa sebagai sampel pada penelitian (Rahmadani *et al.*, 2025). Determinasi menggunakan seluruh bagian tanaman sambung nyawa. Proses determinasi dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.

2. Preparasi sampel

Daun sambung nyawa dipanen pagi hari pada pukul 08.00-10.00, dengan memetik 4-5 helai kearah pucuk yaitu urutan ke 2 hingga ke 5 menuju pucuk (Wijayanti, 2012). Selanjutnya daun sambung nyawa disortasi basah dengan cara dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran. Kemudian ditiriskan dan

dikering anginkan. Daun yang telah dikering anginkan selanjutnya dikeringkan menggunakan oven bersuhu 40°C selama 2 hari hingga kering dengan kriteria daun mudah hancur saat diremas (Warnis & Angelina, 2022). Simplisia daun sambung nyawa yang kering, kemudian digrinder hingga menjadi serbuk halus dan disaring dengan ayakan 40 mesh untuk menghasilkan serbuk simplisia dengan ukuran seragam (Rahmadani *et al.*, 2025).

3. Ekstraksi sampel

Daun sambung nyawa seberat 100 g kemudian dilarutkan dalam masing-masing konsentrasi pelarut etanol yaitu 70% dan 96% dengan volume tiap konsentrasi pelarut yaitu 1000 mL, sehingga perbandingannya 1:10 (b/v). Sampel dibagi kedalam dua labu erlenmeyer, masing-masing wadah terdiri dari 50 g serbuk dan 500 mL pelarut. Kemudian diekstraksi menggunakan *ultrasonic bath* selama 20 menit pada suhu 45°C. Larutan disaring menggunakan kain saring dan kertas *whatman* no 1 hingga diperoleh filtrat 1. Residu diekstraksi kembali menggunakan 500 mL etanol pada masing-masing konsentrasi yaitu 70%, dan 96% dengan cara yang sama hingga diperoleh filtrat 2. Kemudian filtrat 1 dan 2 digabungkan dan diuapkan pada suhu 50°C menggunakan penangas air dan dilanjutkan diuapkan diatas *waterbath* bersuhu 50 °C hingga didapatkan ekstrak kental daun sambung nyawa (Sari *et al.*, 2024). Ekstrak kental yang didapatkan, selanjutnya dilakukan perhitungan % rendemen menggunakan persamaan (1).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{bobot awal simplisia}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

4. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air ditentukan dengan alat *moisture analyzer*. Sejumlah 0,5 g ekstrak pada masing-masing ekstrak etanol 70%, dan 96% dimasukkan ke cawan *moisture analyzer*. Kemudian alat dioperasikan pada suhu 105°C hingga diperoleh hasil yang tertera pada layar. Kadar air yang tertera dilayar dicatat dan dievaluasi dengan persyaratan kadar air yang baik adalah <10% (Warnis & Angelina, 2022).

5. Organoleptis Ekstrak daun sambung nyawa

Pengujian organoleptis ekstrak dilakukan dengan mengamati karakteristik fisik meliputi bau, bentuk, dan warna secara visual atau dengan indra (Rahmadani *et al.*, 2025).

6. Uji fitokimia

Skrining fitokimia kualitatif dilakukan menggunakan reagen spesifik untuk mengidentifikasi metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak daun sambung nyawa, meliputi alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, dan tanin (Parlin *et al.*, 2022)

a. Alkaloid

Identifikasi alkaloid dilakukan menggunakan reagen mayer, wagner, dan dragendorff. Sejumlah 10 mg dari masing-masing ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan dengan sedikit larutan HCl 2N ke masing-masing tabung, dikocok hingga homogen. Langkah berikutnya adalah menambahkan 3 tetes reagen yang berbeda yaitu tabung A ditambahkan reagen mayer, ke tabung B ditambahkan reagen wagner, dan ke tabung C ditambahkan reagen dragendorff. Hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih kekuningan pada tabung A setelah ditambahkan reagen mayer, endapan berwarna coklat dalam tabung B setelah ditambahkan reagen wagner, dan endapan berwarna jingga atau merah dalam tabung C setelah ditambahkan reagen dragendorff. Sampel dikatakan mengandung alkaloid apabila minimal didapat endapan pada dua atau lebih pereaksi pengendapan yang dilakukan (Oktavia & Sutoyo, 2021).

b. Flavonoid

Masing-masing ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan menggunakan 5 mL etanol. 0,5 g serbuk magnesium dan 3 tetes asam klorida pekat ditambahkan ke dalam masing-masing tabung, dan dikocok kuat. Perubahan sampel menjadi warna merah, kuning, atau orange menunjukkan adanya flavonoid dalam sampel (Warnis & Angelina, 2022).

c. Saponin

Identifikasi saponin diuji dengan melarutkan 10 mg dari masing-masing ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa dengan air 5 mL. Kemudian kocok selama 1 menit hingga terbentuk busa dengan tinggi 1-10 cm. Selanjutnya tambahkan 4 tetes larutan HCl 2N kemudian diamati kestabilan busa.

Jika busa dapat bertahan secara stabil selama ± 10 menit menunjukkan hasil positif adanya saponin (Oktavia & Sutoyo, 2021).

d. Tanin

Prosedur pengujian tanin dilakukan dengan melarutkan sebanyak 10 mg dari setiap ekstrak etanol 70% dan 96% daun sambung nyawa dengan etanol *p.a.* Kemudian, 1 mL larutan direaksikan dengan 5 tetes FeCl_3 1%. Munculnya warna warna biru tua atau hitam kehijauan mengindikasikan keberadaan tanin (Oktavia & Sutoyo, 2021).

e. Fenolik

Kandungan fenolik diidentifikasi dengan melarutkan 1 mg sampel dari masing-masing ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa dalam 10 tetes metanol hingga larut. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi warna biru, ungu, atau kemerahan setelah penambahan 6 tetes larutan FeCl_3 5%, (Oktavia & Sutoyo, 2021).

f. Terpenoid

Uji terpenoid dilakukan dengan melarutkan 1 mg ekstrak sampel dari masing-masing ekstrak etanol 70% dan 96% daun sambung nyawa dengan n-heksan. Kemudian dicampur dengan 1 mL CH_3COOH glasial dan 1 mL larutan H_2SO_4 pekat dalam tabung reaksi. Munculnya cincin coklat kemerahan pada perbatasan dua cairan menandakan hasil positif terpenoid (Fajriaty *et al.*, 2018).

7. Identifikasi senyawa flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Pembuatan fase gerak dan penentuan bejana

Langkah awal penentuan flavonoid pada penelitian ini dilakukan dengan optimasi fase gerak. Berdasarkan penelitian Warnis & Angelina, (2022) fase gerak yang dapat digunakan adalah n-butanol : asam asetat : air (4:1:5), sedangkan berdasarkan Kementrian Kesehatan RI, (2017) menggunakan n-Heksan, etil asetat, asam format dengan perbandingan (6:4:0,2). Kemudian berdasarkan Asma *et al.*, (2022) menggunakan fase gerak n-heksan : etil asetat : etanol (1:6:1). Fase gerak kemudian dimasukkan ke dalam *chamber*, ditutup secara rapat, dan ditunggu hingga jenuh, yang ditandai dengan fase gerak sudah membasahi seluruh kertas saring. Selanjutnya dievaluasi masing-masing kemampuan fase gerak terhadap hasil elusi

sampel dan ditentukan fase gerak yang akan digunakan (Kementrian Kesehatan RI, 2017).

b. Pembuatan larutan ekstrak dan pembanding

Ekstrak etanol 70%, dan 96% masing-masing ditimbang sejumlah 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 1 mL etanol *p.a* untuk mencapai konsentrasi 10.000 ppm. Larutan standar kuersetin dibuat dengan melarutkan 25 mg kuersetin dalam etanol *p.a* hingga volumenya mencapai 25 mL menghasilkan konsentrasi 1000 ppm (Warnis & Angelina, 2022).

c. Identifikasi senyawa flavonoid dengan uji KLT

Identifikasi dilakukan menggunakan KLT, dengan plat silika gel F₂₅₄ berukuran lebar 5 cm dan tingg 10 cm yang telah diberi tepi batas atas bawah 1 cm sebagai fase diam. Plat silika gel F₂₅₄ diaktifkan dengan cara dipanaskan selama 30 menit pada suhu 100°C. Ekstrak etanol 70% dan 96% daun sambung nyawa ditotolkan pada plat silika gel F₂₅₄ yang sudah aktif dengan pipa kapiler sebanyak 3 µL dan standar sebanyak 1 µL menggunakan pipa kapiler di bagian garis plat bawah. Plat tersebut dielusi dalam *chamber* yang telah jenuh dan tertutup rapat, amati hingga eluen mencapai batas atas plat silika gel F₂₅₄. Bercak yang terbentuk diamati dibawah sinar UV 245 nm dan 365 nm pada alat detektor UV. Plat KLT selanjutnya disemprot dengan pereaksi AlCl₃ 5% untuk mengamati perubahan warna yang terjadi pada bercak (Yani *et al.*, 2023).

8. Penetapan kadar total flavonoid

a. Pembuatan larutan standar kuersetin

Larutan baku kuersetin dibuat dengan melarutkan sebanyak 25 mg standar kuersetin menggunakan etanol *p.a* dalam labu takar 25 mL hingga diperoleh larutan stok konsentrasi 1000 ppm. Larutan stok dipipet 1 mL lalu ditambahkan etanol *p.a* menggunakan labu takar 10 mL, sehingga menghasilkan larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm. Dibuat larutan seri kadar 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, dan 60 ppm dalam labu takar 10 mL (Saputri & Sa'ad, 2023).

b. Pembuatan AlCl₃ 10%

Ditimbang serbuk AlCl₃ 2,5 g dilarutkan dengan akuades hingga volumenya 25 mL (Warnis & Angelina, 2022).

c. Pembuatan larutan kalium asetat 1M

Kalium asetat sebanyak 2452,5 mg dilarutkan dengan aquades di dalam labu takar 25 mL hingga volumenya mencapai tanda batas (Syamsul *et al.*, 2019).

d. Penetapan panjang gelombang maksimum kuersetin

Sebanyak 1 mL larutan standar kuersetin konsentrasi 40 ppm ditambahkan dengan etanol *p.a* 1 mL, 0,1 mL kalium asetat 1M, 0,1 mL AlCl₃ 10% dan 2,8 mL akuades dalam labu takar 5 mL. Larutan diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis dalam jarak panjang gelombang 300-600 nm. Panjang gelombang (λ maks) yang diperoleh merupakan absorbansi maksimum yang digunakan untuk mengukur serapan dari sampel ekstrak etanol 70% dan 96% dari daun sambung nyawa (Syamsul *et al.*, 2019).

e. Penentuan *operating time* kuersetin dan AlCl₃ 10%

Pengukuran ditentukan dengan 1 mL standar kuersetin 40 ppm dipipet dan dicampurkan dengan etanol *p.a* 1 mL, 0,1 mL kalium asetat 1M, 0,1 mL AlCl₃ 10% dan 2,8 mL akuades dalam labu takar 5 mL (Syamsul *et al.*, 2019). Larutan kemudian diukur serapannya selama 60 menit dengan interval satu menit pada panjang gelombang maksimal yang diperoleh sebelumnya (Yani *et al.*, 2023). Penetapan *operating time* bertujuan untuk mengetahui waktu pengukuran suatu senyawa yang diperoleh saat absorbansi paling stabil. Waktu serapan yang stabil ditetapkan sebagai waktu operasi (Yani *et al.*, 2023).

f. Pembuatan kurva baku kuersetin

Masing-masing larutan kuersetin konsentrasi 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, dan 60 ppm diambil sebanyak 1 mL, kemudian dicampurkan etanol *p.a* 1 mL, 0,1 mL kalium asetat 1M, 0,1 mL AlCl₃ 10% dan 2,8 mL akuades dalam labu takar 5 mL. Campuran diinkubasi selama *operating time* yang didapat sebelumnya pada suhu kamar. Selanjutnya, nilai serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang didapat (Saputri & Sa'ad, 2023).

g. Pembuatan larutan uji

Larutan dengan konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan cara diambil 10 mg dari setiap ekstrak etanol 70% dan 96% dari daun sambung nyawa. Kemudian

ditambahkan etanol *p.a* hingga volumenya mencapai 10 mL dalam labu takar (Warnis & Angelina, 2022).

h. Penentuan kadar flavonoid total

Diambil 1 mL dari masing-masing ekstrak etanol 70%, dan ekstrak etanol 96%. Lalu pada masing-masing ekstrak ditambahkan etanol *p.a* 1 mL, 0,1 mL kalium asetat 1M, 0,1 mL AlCl₃ 10% dan 2,8 mL akuades dalam labu takar 5 mL, lalu diinkubasi selama *operating time* pada suhu kamar. Absorbansi setiap sampel diukur dengan *instrument* spektrofotometer UV-Vis sebanyak tiga kali pengulangan pada panjang gelombang maksimum (Syamsul *et al.*, 2019).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penentuan nilai *Rf* KLT

Nilai Retention Factor (*Rf*) berperan sebagai penanda untuk mengidentifikasi senyawa tertentu. Munculnya noda pada plat silika gel ketika disinari UV pada panjang gelombang 254 dan 365 nm menandakan hasil positif. Selanjutnya dilakukan perhitungan untuk mendapatkan nilai *Rf* dengan menggunakan persamaan (2) (Yani *et al.*, 2023):

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}} \dots\dots\dots(2)$$

2. Penentuan kadar flavonoid total

Standar kurva baku dibuat menggunakan kuersetin dengan berbagai konsentrasi. Dari kurva ini didapatkan persamaan regresi linier ($y = bx + a$) yang digunakan sebagai dasar perhitungan kadar total flavonoid dalam setiap ekstrak. Hasil Kadar Total Flavonoid Content (TFC) dinyatakan sebagai milligram kuersetin per gram sampel, yang disingkat sebagai mg QE/g sampel dengan persamaan (3) (Dewi *et al.*, 2018):

$$TFC = \frac{C.V.Fp}{m} \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan:

TFC = kadar flavonoid total (mg QE/g)

C = kesetaraan larutan standar kuersetin (mg/L)

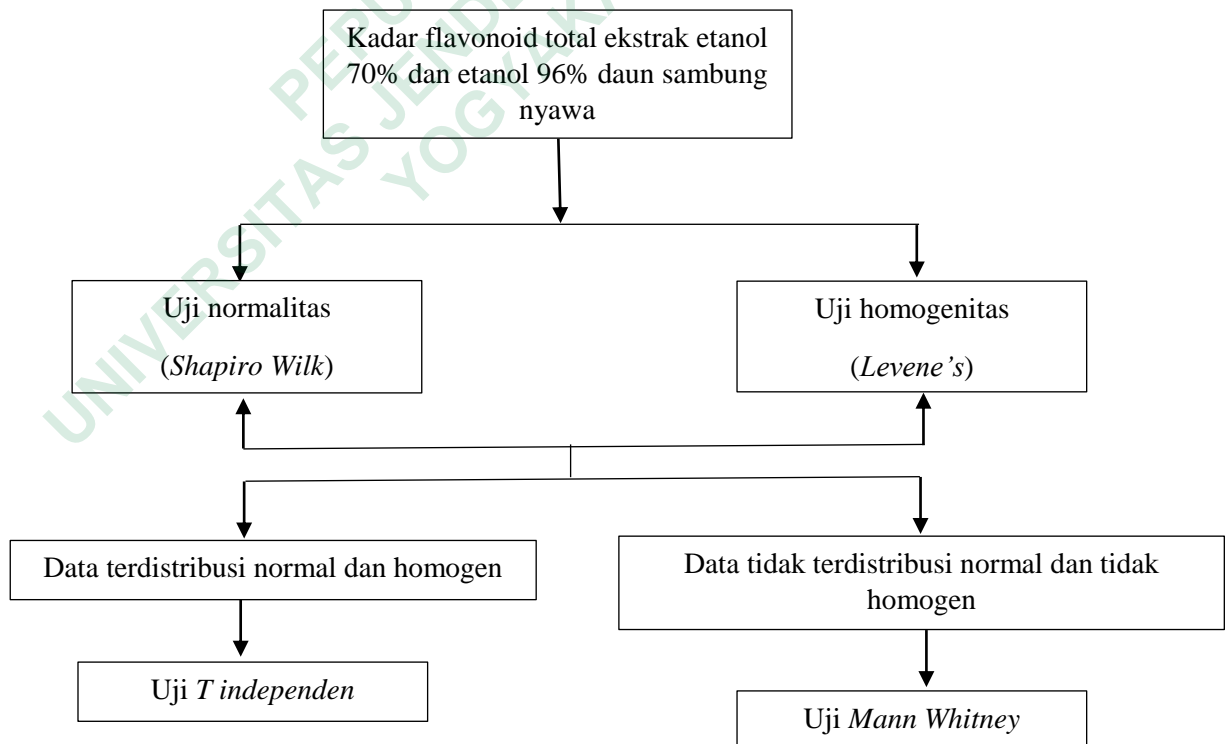
V = volume sampel yang digunakan (L)

Fp = faktor pengenceran

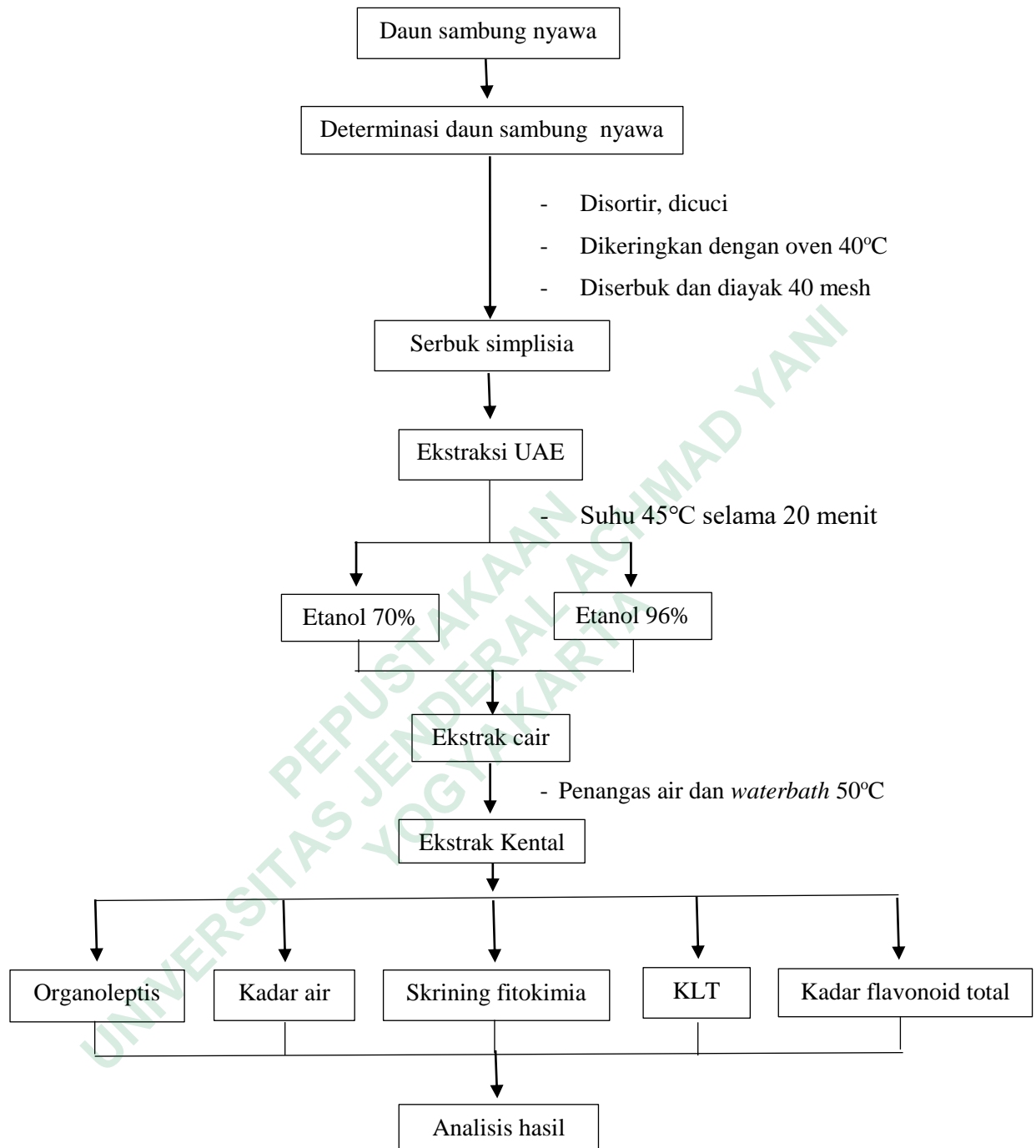
m = massa/berat sampel yang digunakan (g)

3. Analisis statistika

Analisis statistika bertujuan untuk mengetahui bagaimana perbedaan konsentrasi pelarut ekstrak yang digunakan yaitu etanol 70% dan etanol 96% berdampak pada kadar flavonoid total ekstrak daun sambung nyawa. Data kadar flavonoid total dari ekstrak etanol 70% dan etanol 96% daun sambung nyawa dianalisis secara statistik menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Pertama, dilakukan uji *Levene's* untuk menguji homogenitas data kadar flavonoid, diikuti dengan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* karena data kurang dari 50. Hasil dari kedua pengujian tersebut akan menunjukkan data homogen dan terdistribusi secara normal jika nilai $p > 0,05$. Jika data homogen dan terdistribusi secara normal dilanjutkan uji *T Independen* untuk menentukan signifikansi perbedaan kadar flavonoid total ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa.



Gambar 10. Skema analisis statistika



Gambar 11. Alur Penelitian