

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan yaitu dengan metode eksperimental laboratorium. Diawali dengan melakukan pengurusan perizinan penelitian di laboratorium, determinasi sampel tumbuhan, pengambilan dan pembuatan simplisia, ekstraksi sampel tumbuhan dengan menggunakan pelarut Etanol 70%, dan dilakukan identifikasi senyawa organik pada sampel atau skrining fitokimia. Dilanjutkan dengan, pengujian kadar senyawa flavonoid total untuk mengetahui kadar senyawa flavonoid yang terkandung dalam sampel.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian berikut dimulai pada bulan Februari 2023 sampai dengan bulan April 2023 di laboratorium Biologi Farmasi dan Kimia Farmasi Universitas Pelita Harapan untuk proses ekstraksi dan skrining fitokimia serta proses kuantitatif penentuan kadar senyawa flavonoid total.

#### **3.3 Populasi sampel**

Penelitian ini menggunakan populasi tumbuhan Yakon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob) yang diperoleh di Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

### 3.4 Sampel Penelitian

Sampel yang dijadikan bahan penelitian pada penelitian berikut yaitu Batang Tanaman Yakon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob). Sampel diperoleh dengan memilih batang yang baik, segar, dan tidak kering.

### 3.5 Variabel Penelitian

Pada penelitian berikut digunakan variabel tunggal yaitu hanya menentukan kadar senyawa flavonoid total dari sampel Batang Yakon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob).

### 3.6 Instrumen Penelitian

#### 3.6.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian berikut diantaranya yaitu, *blender*, oven, timbangan analitik, *aluminium foil*, batang pengaduk, *magnetic stirrer*, bejana kaca, pipet tetes, pipet ukur, micropipet, batang pengaduk, bola hisap, cawan porselain, kertas saring, kuvet, gelas beaker, gelas ukur, labu erlenmeyer, labu ukur, tabung reaksi, plat tetes, spektrofotometer UV-Vis, *rotary evaporator*, penangas air.

#### 3.6.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian berikut diantaranya yaitu, batang yakon, etanol 70%, etanol pro analisis, kuersetin, amyl alkohol, HCl pekat, serbuk magnesium, kloroform, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N, HCl 1 N, HCl 2 N, NaOH 10%,

$\text{FeCl}_3$  1%,  $\text{FeCl}_3$  5%,  $\text{AlCl}_3$  10%,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial,  $\text{CH}_3\text{COOK}$  1M, reagen dragendorff, reagen mayer, dan aqua destillata.

### **3.7 Prosedur Penelitian**

#### **3.7.1 Izin Penelitian di Laboratorium**

Sebelum dilakukannya penelitian di Laboratorium Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Pelita Harapan, terlebih dahulu dilakukan pengurusan form izin penelitian di Laboratorium ke bagian penanggung jawab Laboratorium Biologi Farmasi dan Laboratorium Kimia Farmasi.

#### **3.7.2 Determinasi Tumbuhan**

Determinasi tumbuhan untuk mengetahui identitas dari sampel tumbuhan akan dilakukan di BRIN (Badan Riset dan Inovasi Nasional), Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat.

#### **3.7.3 Pembuatan Simplisia**

Batang Yakon diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah yang dipanen dengan mengambil Batang yang masih dalam kondisi baik dan tidak terlalu tua dengan berat awal sebesar 4000gr. Batang yakon dipisahkan dari daun yang menyelubungi batang, kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan pengotor yang terbawa ketika proses panen, dilanjutkan dengan pencucian batang di bawah air mengalir disertai pembilasan untuk memastikan

batang bersih dari cemaran debu dan kotoran. Lalu batang diperkecil ukurannya dengan cara dirajang untuk memudahkan dalam proses pengeringan, dilanjutkan dengan proses pengeringan dengan menggunakan instrument yaitu *oven* dengan suhu 45°C selama 10 jam, penggunaan *oven* yaitu untuk mempercepat proses pengeringan dan dapat memantau suhu selama proses pengeringan dilakukan, selanjutnya ketika sampel batang sudah kering merata maka dilakukan penimbangan berat kering sampel yang diperoleh, sampel batang Yakon yang telah kering secara keseluruhan dihaluskan dengan menggunakan *blender*, kemudian diayak. Hasil ayakan serbuk simplisia batang Yakon yang sudah halus kemudian ditimbang dan disimpan dalam wadah yang tertutup baik.

#### **3.7.4 Pembuatan Ekstrak**

Pada penelitian ini, Batang Yakon di ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Sebanyak 300gr serbuk simplisia yang diperoleh ditempatkan dalam toples kaca, kemudian ditambahkan dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3000mL, ditutup rapat dan disimpan dalam bejana maserasi, pastikan terlindung dari cahaya matahari langsung selama 6 hari sembari dilakukan pengadukan sehari 2 kali (12 jam sekali). Setelahnya, ekstrak disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan residu yang dihasilkan selama proses ekstraksi, filtrat yang diperoleh disaring kembali dan dipekatkan pada *rotary evaporator* dengan suhu 40°C hingga pelarut menguap dan ekstrak menjadi lebih kental, terakhir dilakukan pengeringan dengan menggunakan oven.

Hasil sampel ekstrak etanol 70% batang Yakon yang diperoleh dilakukan penimbangan dan dicatat berat akhirnya.

### **3.7.5 Uji Kualitatif Skrining Fitokimia**

Metode skrining fitokimia yang dilakukan menurut Harborne (1996) yaitu sebagai berikut:

#### **1. Skrining Alkaloid**

Larutan ekstrak sebanyak 5 mL ekstrak sampel ditambahkan 2 mL kloroform dan 2 mL ammonia lalu disaring. Filtrat yang dihasilkan, diberi penambahan 3 sampai 5 tetes  $H_2SO_4$  pekat lalu dikocok hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan yang terbentuk, dibagi menjadi 2 bagian kemudian bagian pertama ditambahkan pereaksi Mayer dan bagian kedua ditambahkan pereaksi Dragendorff masing-masing 4-5 tetes. Hasil positif dengan pereaksi Dragendorff ditunjukkan dengan adanya endapan kuning jingga atau merah, dan dengan pereaksi mayer ditunjukkan dengan adanya endapan putih.

#### **2. Skrining Fenolik**

Larutan ekstrak sebanyak 1 mL diberi penambahan  $FeCl_3$  5% sebanyak 3-4 tetes. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi hijau, biru, atau hijau kehitaman.

### **3. Skrining Flavonoid dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

Larutan ekstrak sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diberi penambahan (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 N sebanyak 2 tetes dan dikocok kuat. Hasil positif dari uji tersebut ditunjukkan dengan adanya warna merah, kuning, atau coklat.

### **4. Skrining Saponin**

Larutan ekstrak sebanyak 1 mL diberi penambahan 10 mL air sembari dilakukan pengocokan selama 1 menit, lalu diberi penambahan HCl 1 N sebanyak 2 tetes. Hasil positif ditunjukkan apabila busa yang terbentuk tetap stabil ± 7 menit.

### **5. Skrining Tanin**

Larutan ekstrak sebanyak 1 mL dimasukkan ke tabung reaksi dan diberi penambahan FeCl<sub>3</sub> 1% sebanyak 2-3 tetes. Hasil positif ditunjukkan apabila terjadi perubahan warna dari warna awal hijau muda menjadi hijau kehitaman.

### **6. Skrining Steroid/Triterpenoid**

Larutan ekstrak sebanyak 1 mL 10 tetes CH<sub>3</sub>COOH glasial dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sebanyak 2 tetes. Larutan dilakukan pengocokan secara perlahan dan diinkubasi selama beberapa menit. Hasil positif steroid ditunjukkan dengan adanya warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid ditunjukkan dengan adanya warna merah atau ungu.

## 7. Uji Flavonoid Wilstater Cyanidin

Sampel ekstrak etanol 70% batang yakon ditimbang sebanyak 100 mg dan diberi penambahan air panas secukupnya, didihkan larutan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh diberi penambahan serbuk magnesium sebanyak 100 mg dan HCl pekat sebanyak 1 mL, lalu dikocok dengan kuat-kuat. Kemudian diberi penambahan amyl alkohol sebanyak 2 mL. Hasil positif adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan perubahan warna jingga, kuning, atau merah pada lapisan amyl alkohol (Harborne, 1987).

### 3.8 Uji Kuantitatif Penentuan Kadar Flavonoid Total

#### 1. Penyiapan Larutan Uji

##### a. Larutan $AlCl_3$ 10%

Sebanyak 1 gr serbuk  $AlCl_3$  ditimbang dan dilarutkan dengan sebagian aquadest dalam gelas beaker, kemudian dalam labu takar diencerkan dengan aquadest hingga 10mL.

##### b. Kalium Asetat 1M

Sebanyak 0,9814 gr  $CH_3COOK$  dtimbang dan dilarutkan dengan aquadest dalam gelas beaker, kemudian dalam labu takar diencerkan dengan aquadest hingga 10mL.

##### c. Larutan Kontrol

Terlebih dahulu pipet etanol p.a sebanyak 0,6 mL,  $CH_3COOK$  sebanyak 0,04 mL,  $AlCl_3$  10% sebanyak 0,04 mL, dan diencerkan dengan aquadest hingga 2 mL pada microtube.

## 2. Penyiapan Larutan Baku Standar Kuersetin

### a. Larutan Baku Induk Kuersetin 1000 ppm

Serbuk kuersetin ditimbang sebanyak 10 mg, dan dilarutkan dengan etanol p.a dalam gelas beaker, kemudian pindahkan ke dalam labu takar dan cukupkan dengan etanol p.a hingga 10 mL.

## 3. Penentuan Waktu Inkubasi Larutan Kuersetin (*Operating Time*)

Larutan baku kerja konsentrasi 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm dan 120 ppm dipipet sebanyak 0,2 mL, diberi penambahan etanol p.a sebanyak 0,6 mL,  $\text{AlCl}_3$  sebanyak 0,04 mL, dan larutan  $\text{CH}_3\text{COOK}$  1 M sebanyak 0,04 mL. Kemudian encerkan dengan menggunakan aquadest hingga 2 mL. Pengukuran absorbansi dilakukan dari menit 0-40 dengan interval waktu 1 menit, menggunakan panjang gelombang teoritis  $\lambda$  430 nm, hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Lindawati *et al.*, 2020).

## 4. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Kuersetin

Larutan baku kerja konsentrasi 120 ppm dipipet 0,2 mL, ditambahkan etanol p.a sebanyak 0,6 mL, larutan  $\text{AlCl}_3$  sebanyak 0,04 mL, dan larutan  $\text{CH}_3\text{COOK}$  1 M sebanyak 0,04 mL, selanjutnya tambahkan aquadest sampai 2 mL. Larutan diinkubasi sampai tercapainya *operating time*, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang teoritis  $\lambda$  400 – 500 nm (Lindawati *et al.*, 2020).

## 5. Penentuan Kurva Kalibrasi Larutan Kuersetin

Pembuatan kurva kalibrasi dari larutan baku induk konsentrasi 1000 ppm yang dipipet sebanyak 0,08 mL, 0,12 mL, 0,16 mL, 0,2 mL, dan 0,24 mL, selanjutnya diencerkan dengan etanol p.a hingga 2 mL untuk mendapatkan konsentrasi (40, 60, 80, 100, dan 120 ppm). Masing-masing seri konsentrasi dipipet 0,2 mL, masukkan ke dalam microtube 2 mL, tambahkan etanol p.a sebanyak 0,6 mL, larutan  $\text{AlCl}_3$  sebanyak 0,04 ml, dan larutan  $\text{CH}_3\text{COOK}$  1 M sebanyak 0,04 mL, selanjutnya encerkan dengan aquadest sampai dengan 2 mL. Lakukan pengukuran seri kurva kalibrasi menggunakan panjang gelombang maksimum, dan waktu *operating time* mulai dari kadar terkecil sampai kadar terbesar. Prosedur dilakukan secara triplo atau sebanyak 3 kali pengulangan (Lindawati *et al.*, 2020).

## 6. Penetapan Kadar Total Senyawa Flavonoid

Ekstrak etanol 70% batang yakon ditimbang sebanyak 12,5 mg, dilarutkan dengan aquadest sebanyak 25 mL sehingga diperoleh konsentrasi 500 ppm. kemudian larutan dipipet sebanyak 0,2 mL, ditambahkan dengan  $\text{AlCl}_3$  sebanyak 0,04 mL, dan larutan  $\text{CH}_3\text{COOK}$  1 M sebanyak 0,04 mL, cukupkan dengan penambahan aquadest hingga 2 mL. Larutan diinkubasi sampai tercapainya waktu *operating time* dan lakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer visibel dengan panjang gelombang maksimal, prosedur dilakukan secara triplo atau sebanyak 3 kali pengulangan (Lindawati *et al.*, 2020)

### 3.9 Analisis Data Hasil Penelitian

Metode yang diakui oleh Departemen Kesehatan RI untuk penentuan kadar senyawa flavonoid adalah spektrofotometri UV-Vis dengan prinsip kolorimetri. Warna yang terbentuk diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV. Perhitungan ini berdasarkan pada hukum Lambert-Beer yang menunjukkan adanya hubungan yang berbanding lurus antara kadar larutan sampel dengan absorbansi. Digunakan data larutan standar untuk menentukan kadar berdasarkan nilai absorbansi. Persamaan regresi akan dihasilkan dari data larutan standar yang digunakan untuk menentukan kadar flavonoid (Khopkar, 2010).

$$y = ax + b$$

Keterangan:

y = Nilai absorbansi (serapan)

x = Kadar flavonoid

a = Konstant (kemiringan slope kurva linier)

b = Konstanta

r = Koefisien korelasi

Persamaan regresi dinyatakan linier jika nilai r yang diperoleh mendekati 1, atau dengan kata lain yaitu absorbansi dengan konsentrasi sampel memiliki korelasi yang kuat dan berbanding lurus.

Perhitungan kadar flavonoid dapat dihitung dengan menggunakan rumus Geissman (1962) yaitu sebagai berikut:

$$\text{KTF} = \frac{c \times V \times f}{W} \times 100\%$$

Diketahui:

KTF = Jumlah flavonoid metode  $\text{AlCl}_3$

c = Kesetaraan kuersetin ( $\mu\text{g/mL}$ )

V = Volume total ekstrak

f = Faktor pengenceran

W = berat sampel (gr)

Kriteria seksama pada analisis kadar total flavonoid ekstrak etanol 70% batang yakon dapat diberikan jika metode yang digunakan memberikan koefisien variasi  $\leq 2\%$  semakin kecil perolehan % CV maka data yang diperoleh akan semakin baik. Perhitungan (% CV). Perbandingan simpangan kadar flavonoid total dengan rata-rata kadar sampel dapat diketahui dengan melakukan perhitungan persentase koefisien variasi. Persentase koefisien variasi yang baik menunjukkan nilai persentase  $< 2\%$  perhitungan persentase koefisien variasi tercantum pada persamaan berikut (Snyder *et al.*, 2010).

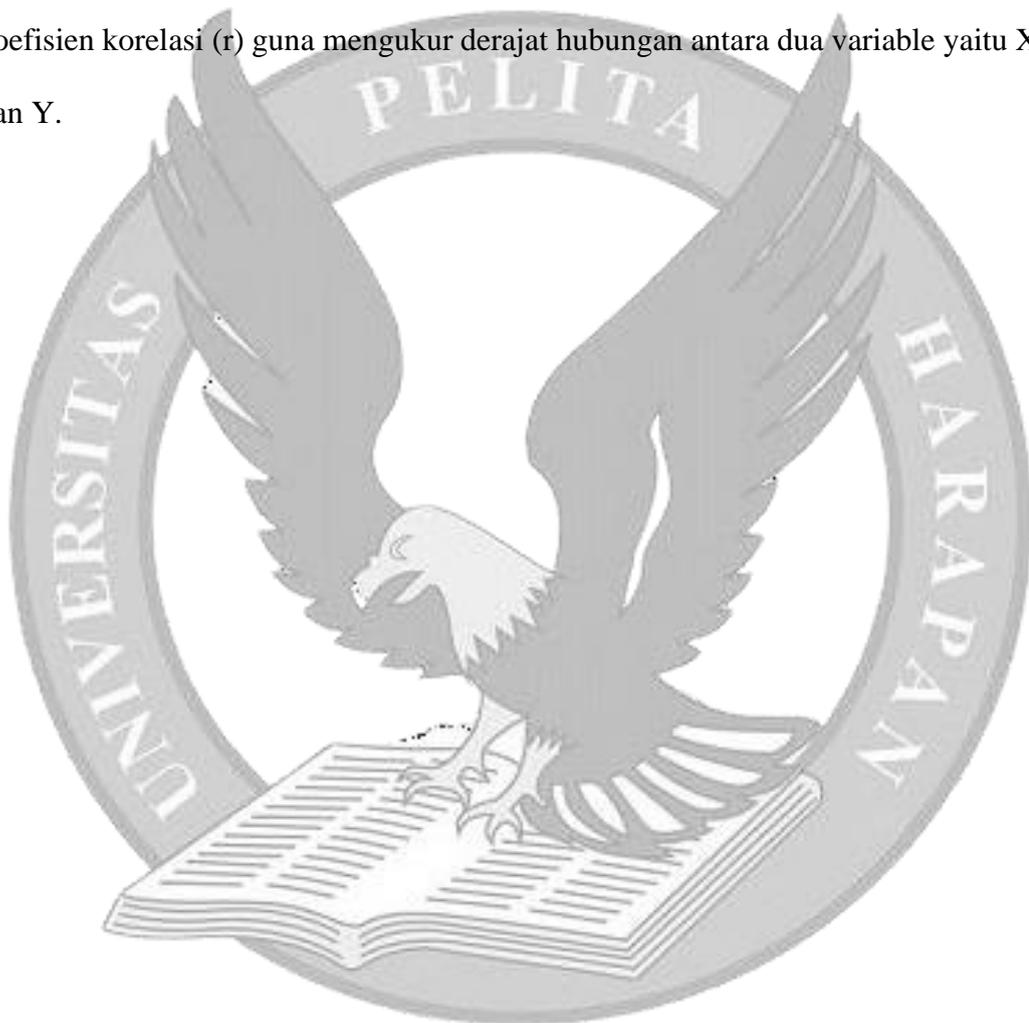
$$\% \text{ CV} = \frac{SD (\sigma)}{\text{Rata - rata kadar sampel (mg)}} \times 100 \%$$

Keterangan:

CV = Coefficient of Variation (Koefisien Variasi)

SD = Standar Deviasi

Data hasil penelitian yang diperoleh berdasarkan perhitungan, akan diolah dengan menggunakan program Microsoft Excel 2021, untuk mengukur nilai koefisien korelasi ( $r$ ) guna mengukur derajat hubungan antara dua variable yaitu X dan Y.



### 3.10 Rancangan Jadwal Penelitian

Tabel 3. 1 Rancangan Jadwal Penelitian

	Kegiatan	Waktu Kegiatan															
		Januari				Februari				Maret				April			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Determinasi tumbuhan			■	■												
2	Pembuatan simplisia				■												
3	Pembuatan ekstrak					■											
4	Uji Kualitatif Skrining Fitokimia						■	■									
5	Uji Kuantitatif Penentuan Kadar Total Flavonoid									■	■	■	■				
6	Analisis dan Pengolahan Data													■	■	■	
7	Penyusunan Laporan Akhir KTI																■

