

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan dan Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental di laboratorium untuk mengetahui kadar fenolik total yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% batang cawat Hanoman (*Tetrastigma* sp. (*Miq.*) *Planch.*).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2023-Mei 2024.

3.2.2 Tempat Penelitian

Tempat penelitian ini dilakukan di laboratorium bahan alam dan laboratorium kimia farmasi Universitas Borneo Lestari.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tentang tumbuhan cawat hanoman (*Tetrastigma* sp. (*Miq.*) *Planch.*) yang ditemukan di Bunglai Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan.

3.3.2 Sampel

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah sampel dari batang cawat hanoman (*Tetrastigma* sp. (*Miq.*) *Planch.*)

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Ekstrak etanol 96% dari batang cawat hanoman.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar total fenol ekstrak etanol 96% batang Cawat Hanoman.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Mesin ketam, timbangan analitik (*Fujitsu FS-AR*[®]), blender (*Miyako*[®]), *rotary evaporator* dengan *Heating Bath (RE100-S – DLAB Scientific*[®]), tabung reaksi (*Pyrex*[®]), pipet tetes, mikropipet (*Dragon LAB TopPette Pipettor 100-1000 µl*[®]), gelas beker (*Pyrex*[®]), gelas ukur, labu ukur (*Iwaki*[®]), spatula batang pengaduk, vial, *waterbath (HH-S6*[®]), *stopwatch*, kuvet dan Spektrofotometer UV-Vis (*DLAB SP-V1100*[®]).

3.5.2 Bahan

Batang Cawat Hanoman (*Tetrastigma* sp. (*Miq.*) *Planch*), aquadest (*Aqua DM Brataco*[®]), etanol 96% (*Emsure*[®]), reagen Folin ciocalteu (*Merck*[®]), aluminium foil (*Klinpak*[®]), lempeng silica gel GF₂₅₄, asam galat, serbuk Na₂CO₃, aquadest, FeCl₃ (Besi III klorida), dan asam asetat.

3.6 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data Penelitian

3.6.1 Pembuatan simplisia

Pengambilan sampel batang Cawat Hanoman (*Tetrastigma* sp. (Miq.) Planch) pada pagi hari sekitar pukul 12.00 WITA di desa bunglai Provinsi Kalimantan Selatan. Setelah selesai pengambilan batang cawat hanoman (*Tetrastigma* sp. (Miq.) Planch), yang harus dilakukan adalah sortasi basah untuk menghilangkan kotoran atau debu yang menempel pada sampel. Setelah bersih lakukan penjemuran dibawah sinar matahari dengan menggunakan kain hitam, jika sudah kering lakukan proses perajangan menggunakan mesin serut kayu (ketam atau planer) untuk menghasilkan bagian kecil atau serutan halus. Setelah itu, sampel dikeringkan lagi di bawah sinar matahari dengan menggunakan kain hitam sebagai penutup. Bertujuan untuk menghindari pengurangan kadar fenolik secara berlebihan. Proses penjemuran dilakukan selama sekitar 2 jam, mulai pukul 08.00-10.00 waktu setempat, hingga sampel benar-benar kering. Setelah mengering, lakukan sortasi kering untuk memisahkan, seperti bagian-bagian tumbuhan yang tidak diinginkan atau pengotoran-pengotoran lainnya yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering (Melinda, 2014). Langkah selanjutnya adalah menimbang sampel kering dan mencatat bobotnya. Setelah itu, haluskan sampel dengan blender dan saring menggunakan mesh 40 untuk mendapatkan hasil yang sempurna. Terakhir, timbang

kembali serbuk yang dihasilkan. Untuk menghindari terjadinya kontaminasi oleh partikel yang tercampur selain simplisia, langkah terakhir yang harus dilakukan adalah mengemas hasil serbuk secara rapi dan hati-hati dengan menggunakan kertas, plastik, maupun karung goni (Laksana, 2010).

3.6.2 Determinasi sampel

Determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Dasar Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lambung Mangkurat.

3.6.3 Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi ini dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Serbuk simplisia diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 96% dalam perbandingan 1:4 (simplisia 125g : 500 etanol 96%). Lalu larutkan sampel di aduk hingga homogen Ekstraksi dilakukan pada suhu ruangan sekitar 20-25°C dan dibiarkan selama 24 jam. Pada penelitian ini, dilakukan 1 kali maserasi yang didiamkan selama 24 jam. Proses ekstraksi tersebut melibatkan 1 kali maserasi dan 2 kali remaserasi. Selama ekstraksi berlangsung, dilakukan pengadukan 6 jam pertama dan diamkan selama 18 jam (Istiqomah, 2013). Setelah dilakukan, langkah selanjutnya adalah menyaring hasil dari maserasi tersebut dan memisahkan ekstrak cair dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* (pemisahan ekstrak dengan pelarut) lalu ekstrak yang telah selesai dirotary dilakukan

pemanasan menggunakan water bath dilakukan 2 kali sampai mendapatkan nilai bobot tetap yakni tidak lebih dari 0,5mg. Setelah mendapatkan bobot tetap hitung rendemen dengan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (gram)}}{\text{Bobot simplisia sebelum diekstraksi (gram)}} \times 100\%$$

3.6.4 Skrining Fitokimia Fenolik pada ekstrak etanol 96% batang Cawat Hanoman (*Tetrastigma* sp. (*Miq.*) *Planch*)

1. Uji fenol

Timbang 0,1 g sampel ekstrak etanol batang cawat Hanoman, larutkan dalam reagen, kemudian tambahkan 2 tetes larutan FeCl₃ 10%. Hasil pengujian menunjukkan sampel positif mengandung senyawa fenolik jika pengujian memberikan hasil berwarna hijau, merah, ungu, biru atau hitam menunjukkan positif.mengandung senyawa fenolik (Najoan *et al.*, 2016).

3.7 Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak etanol 96% Batang Cawat

Hanoman

3.7.1 Pembuatan Larutan Induk Asam Galat

Asam galat sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dalam 1 mL etanol p.a. selanjutnya diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas 10 mL, sehingga diperoleh hasil konsentrasi larutan induk 1000 ppm (Khadijah *et al.*, 2017).

3.7.2 Pembuatan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Sebanyak 0,5 mL larutan asam galat 50 ppm ditambahkan dengan reagen *Folin-Ciocalteu* sebanyak 5 ml. (sebelumnya sudah diencerkan dengan aquadest 1:10), diamkan 5 menit, lalu ditambahkan 4 ml Na_2CO_3 1M. Campur sampai homogen dan diamkan pada suhu kamar dalam kondisi gelap selama 50-55 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm (Soraya, 2022; Kurnia dkk, 2020).

3.7.3 Penentuan *Operating Time*

Operating time yang digunakan berdasarkan studi literatur. Menurut penelitian Wulandari dkk., (2020); Darwis, (2022); Putri & Khonsa, (2022); Rizki dkk., (2022); dan Saputri dkk., (2023) yang menunjukkan bahwa nilai absorbansi yang stabil pada penetapan kadar fenol total dapat diketahui setelah 50-55 menit.

3.7.4 Pembuatan Kurva Baku Asam Galat

Larutan induk asam galat dari 1000 diambil sebanyak 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 dan 0,7 ml, lalu masukkan pada masing-masing labu yang berukuran 10 ml. ditambahkan dengan etanol p.a 1ml, kemudian diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas 10 ml. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan hasil larutan sari kadar, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm dan 70ppm (Ulya, 2020).

Larutan sari kadar yang telah dibuat masing-masing diambil 0,5 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, setelah itu

ditambahkan 5 mL reagen *Folin-Ciocalteu* (sebelumnya telah diencerkan dengan aquadest 1:10) digojok. Diamkan selama 5 menit, masing-masing larutan ditambahkan Na₂CO₃ 1M sebanyak 4 ml., digojok sampai homogen, lalu didiamkan selama 50-55 menit pada suhu kamar dan dalam kondisi gelap. Pembacaan gelombang maksimum pada seri kadar menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui hasil yang didapat (Soraya, 2022; Kurnia dkk, 2020; Wahdaningsih dkk, 2017).

3.8 Analisis data

3.8.1 Penetapan Kadar Total Fenol Ekstrak Etanol Batang Cawat Hanoman (*Tetrastigma* sp. (Miq.) Planch)

Nilai absorbansi larutan uji dimasukkan ke dalam regresi linier $y = bx + a$ larutan standar asam galat (Salmia 2016). Kandungan fenolik total dinyatakan dalam miligram ekuivalen asam galat per gram ekstraksi (mg GAE/g) (Sabandar *et al.*, 2020). Kadar total fenolik dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Total Fenol} = \frac{C \times V \times Fp}{M}$$

Keterangan:

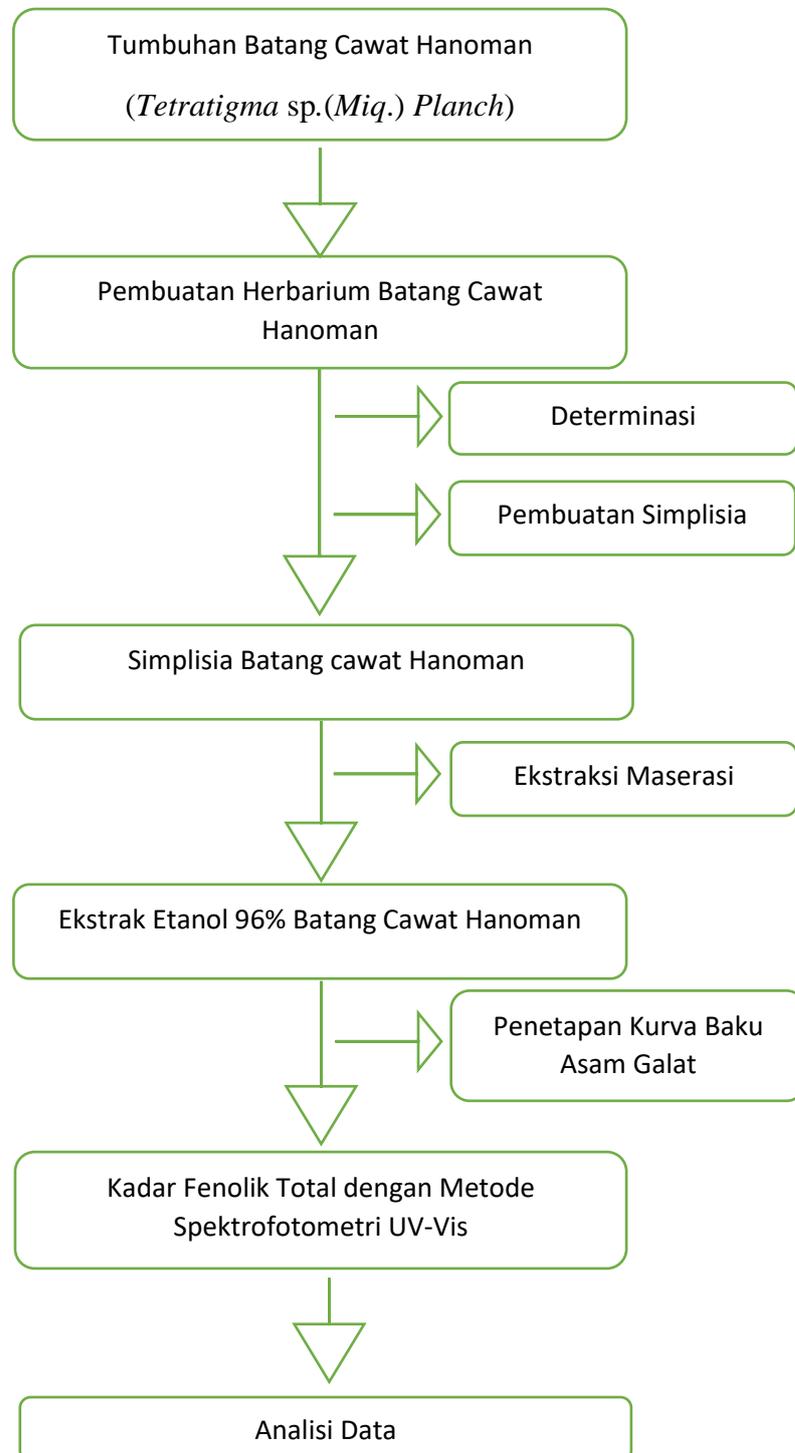
C : Konsentrasi Asam Galat

V : Volume

M : Berat sampel

Fp : Faktor Pengenceran

3.9 Kerangka Operasional



Gambar 4 Kerangka Operasional