

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kualitatif deskriptif di laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh metode perkolasi – refluks pelarut etil asetat – etanol 70% pada skrining fitokimia dan profil KLT ekstrak umbi bawang dayak (*Eleutherine bulbosa* (Urb.) Mill). Serta untuk mengetahui senyawa marker yang terdapat pada ekstrak umbi bawang dayak (*Eleutherine bulbosa* (Urb.) Mill).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Borneo Lestari, Banjarbaru, Kalimantan Selatan pada bulan Februari – Mei 2024.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini yaitu tanaman umbi bawang dayak (*Eleutherine bulbosa* (Urb.) Mill), sampel penelitian ini diperoleh dari Landasan Ulin, Kota Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

3.4 Variabel

Pengertian operasional suatu variabel adalah batasan ruang lingkup operasional bagaimana cara mengukur variabel yang diteliti. Variabel ini dibagi menjadi dua bagian yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang dapat mempengaruhi atau menyebabkan perubahan.

Sedangkan variabel terikat adalah faktor yang kemudian akan diukur dan diamati oleh peneliti untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh variabel bebas tersebut.

3.4.1 Variabel Bebas (Independent)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah metode ekstraksi umbi bawang dayak (*Eleutherine bulbosa* (Urb.) Mill) yaitu metode perkolasi dan refluks. Serta jenis pelarut yang digunakan yaitu etil asetat dan etanol 70%.

3.4.2 Variabel Terikat (Dependent)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil skrining fitokimia dan hasil profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak umbi bawang dayak (*Eleutherine bulbosa* (Urb.) Mill).

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah aluminium foil, batang pengaduk (PT. *Pandu Multi Jaya*[®]), blender (*Maspion*[®]), cawan porselen (PT. *Pandu Multi Jaya*[®]), chamber, gelas beker (*Pyrex*[®]), gelas ukur (*Pyrex*[®]), hot plate, kertas saring, labu ukur (*Pyrex*[®]), lampu UV 256 nm dan 366 nm, lemari asam, mesh 20 (*Pharmalab*[®]), mikropipet (*Dragon Lab*[®]), oven (*Memmert*[®]), penampak bercak, pipa kapiler, pipet, *rotary evaporator* (IKA[®]), rak dan tabung reaksi (*Pyrex*[®]), seperangkat alat perkolasi, seperangkat alat refluks, timbangan analitik (OHAUS[®]), vial, serta *waterbath* (*Memmert*[®]).

3.5.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak adalah umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa (Urb.) Mill*), etil asetat dan etanol 70% (*Merck*[®]). Bahan untuk skrining fitokimia dan KLT adalah amil alkohol, asam sitroborat, aquadest, FeCl₃ (PT. *Kimia Jaya*), gelatin, H₂SO₄ (*Merck*[®]), HCL pekat (*Nitrat kimia*), kloroform (*Merck*[®]), KOH (*Arkitos*[®]), logam magnesium, metanol p.a (*Emsure*[®]), NaOH (*Merck*[®]), pembanding *eleutherine*, pereaksi *Dragendorff* (*Nitrat kimia*), pereaksi *Liebarmann Burchard*, pereaksi *Mayer* (*Nitrat kimia*), pereaksi *Wegner* (*Nitrat kimia*).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Sampel

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Dasar Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru. Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas tumbuhan yang akan digunakan apakah sesuai dengan yang diinginkan (Klau *et al*, 2021).

3.6.2 Pengambilan Sampel

Sampel tanaman umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa (Mill) Urb.*) yang diambil dari lokasi tempat tumbuh di Kelurahan Landasan Ulin Utara, Kecamatan Liang Anggang, Kota Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

3.6.3 Pembuatan Simplisia

Sampel umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.) yang diperoleh kemudian disortir basah untuk memisahkan benda asing dan dicuci dengan air bersih yang mengalir, dibersihkan dari akar dan daunnya, lalu dirajang setipis 1-2 mm, dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 8 jam hingga simplisia bersifat mudah rapuh. Lalu dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk, kemudian diayak dengan mesh 20 disimpan dalam wadah tertutup (Fitriah *et al*, 2023).

3.6.4 Pembuatan Ekstrak

3.6.4.1 Metode Perkolasi

1. Etil Asetat

Metode perkolasi umbi Bawang Dayak dibuat menggunakan 50 gram simplisia dan 250 mL pelarut etil asetat. Pasang alat perkolator yang sudah dibersihkan dan keringkan. Sumbat leher alat dengan kapas dan lapisasi dasar alat dengan kertas saring. Masukkan simplisia 50 gram yang telah dibasahi terlebih dahulu dengan pelarut etil asetat selama 2 jam untuk memberikan pelarut kontak dengan simplisia hingga simplisia mengembang. Kemudian pelarut dialirkan pelarut secara perlahan sampai pelarut mulai menetes dengan kecepatan 1 mL/menit sambil terus ditambahkan berulang kali pelarut ekstraksi yang baru agar serbuk terus terendam dalam

pelarut. Hasil ekstraksi diperoleh dari tetesan perkolat tersebut (Tutik *et al*, 2022). Filtrat yang diperoleh selanjutnya dilakukan evaporasi. Evaporasi dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. selanjutnya dilakukan pemekatan dengan *waterbath* pada suhu 50°C, hingga diperoleh ekstrak pasta dan dihitung rendemennya (Susanty *et al*, 2016).

2. Etanol 70%

Metode perkolasi umbi Bawang Dayak dibuat menggunakan 50 gram simplisia dan 250 mL pelarut etanol 70%. Pasang alat perkolator yang sudah dibersihkan dan keringkan. Sumbat leher alat dengan kapas dan lapis dasar alat dengan kertas saring. Masukkan simplisia 50 gram yang telah dibasahi terlebih dahulu dengan pelarut etanol 70% selama 2 jam untuk memberikan pelarut kontak dengan simplisia hingga simplisia mengembang. Kemudian pelarut dialirkan pelarut secara perlahan sampai pelarut mulai menetes dengan kecepatan 1 mL/menit sambil terus ditambahkan berulang kali pelarut ekstraksi yang baru agar serbuk terus terendam dalam pelarut. Hasil ekstraksi diperoleh dari tetesan perkolat tersebut (Tutik *et al*, 2022). Filtrat yang diperoleh selanjutnya dilakukan evaporasi. Evaporasi dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. selanjutnya

dilakukan pemekatan dengan *waterbath* pada suhu 50°C, hingga diperoleh ekstrak pasta dan dihitung rendemennya (Susanty *et al*, 2016).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Berat simplisia yang diekstraksi (g)}} \times 100\%$$

Bobot tetap diperoleh jika dua kali penimbangan berturut-turut berbeda tidak lebih dari 0,25% setelah dikeringkan selama 1 jam atau jika selisih penimbangan tidak melebihi 0,5 mg bila ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik (Depkes RI, 2017).

3.6.4.2 Metode Refluks

1. Etil Asetat

Pada penelitian ini melakukan modifikasi cara dari (Hasnaeni *et al*, 2019). Menggunakan 50 gram serbuk simplisia dan 200 mL etil asetat yang dimasukkan kedalam tabung alas bulat lalu rangkai dengan kondensor refluks dan letakkan di atas *heating mantle*. Proses refluks dilakukan selama 3 jam pada suhu 77°C. Refluks dilakukan 3 kali untuk tiap 50 gram (Hasnaeni *et al*, 2019). Filtrat yang diperoleh selanjutnya dilakukan evaporasi. Evaporasi dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. selanjutnya dilakukan pemekatan dengan *waterbath* pada suhu 50°C, hingga diperoleh ekstrak pasta dan dihitung rendemennya (Susanty *et al*, 2016).

2. Etanol 70%

Pada penelitian ini melakukan modifikasi cara dari (Hasnaeni *et al*, 2019). Menggunakan 50 gram serbuk simplisia dan 200 mL etanol 70% yang dimasukkan kedalam tabung alas bulat lalu rangkai dengan kondensor refluks dan letakkan di atas *heating mantle*. Proses refluks dilakukan selama 3 jam pada suhu 79°C. Refluks dilakukan 3 kali untuk tiap 50 gram (Hasnaeni *et al*, 2019). Filtrat yang diperoleh selanjutnya dilakukan evaporasi. Evaporasi dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. selanjutnya dilakukan pemekatan dengan *waterbath* pada suhu 50°C, hingga diperoleh ekstrak pasta dan dihitung rendemennya (Susanty *et al*, 2016).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Berat simplisia yang diekstraksi (g)}} \times 100\%$$

Bobot tetap diperoleh jika dua kali penimbangan berturut-turut berbeda tidak lebih dari 0,25% setelah dikeringkan selama 1 jam atau jika selisih penimbangan tidak melebihi 0,5 mg bila ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik (Depkes RI, 2017).

3.6.5 Skrining Fitokimia

3.6.5.1 Uji alkaloid

Sebanyak 0,5 g ekstrak kental masing- masing dilarutkan 5 mL aquadest dan HCl 2N di tabung reaksi, dipanaskan selama 2 menit, kemudian didinginkan. Ambil filtrat sebanyak 3 tetes untuk ditambahkan reagen. Reagen *Mayer* membentuk endapan berwarna putih jika mengandung alkaloid, untuk reagen *Wegner* apabila positif mengandung senyawa alkaloid akan menghasilkan endapan coklat, dan reagen *Dragendorff* akan menghasilkan endapan jingga atau merah apabila mengandung senyawa alkaloid (Pertwi *et al*, 2022).

3.6.5.2 Uji Fenol

Sebanyak 0,1 g ekstrak masing- masing diekstrak dengan 2 mL, kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl₃ 10%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuk warna hijau atau hijau kebiruan (Nugrahani *et al*, 2016).

3.6.5.3 Uji Flavonoid

Sebanyak 0,1 g ekstrak dilarutkan ke dalam 5 mL aquadest di dalam tabung reaksi, selanjutnya tambahkan Mg serbuk 100 mg, HCl pekat 1 mL dan amil alkohol 2 mL dikocok, biarkan memisah. Apabila larutan berwarna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol maka positif mengandung senyawa flavonoid (Nugrahani *et al*, 2016).

3.6.5.4 Uji Kuinon

Sebanyak 0,1 g sampel ditambahkan NaOH 1 N beberapa tetes kemudian panaskan di penangas air. Apabila terbentuk warna merah menunjukkan adanya kuinon (Muthoharoh & Zainab, 2015).

3.6.5.5 Uji Saponin

Sebanyak 0,1 g ekstrak kemudian ditambahkan dengan 10 mL aquadest. Kocok selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 menit. Tambahkan HCl 2N sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang berisi sampel. Sampel dinyatakan positif jika buih yang terbentuk stabil setelah penambahan HCl (Ramadhan *et al*, 2020).

3.6.5.6 Uji Steroid/Terpenoid

Sebanyak 0,1 g ekstrak dilarutkan dalam tabung reaksi dengan 2 mL kloroform, kemudian ditambahkan 10 tetes asetat anhidrida dan 3 tetes H₂SO₄ pekat. Hasil uji reaksi positif terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna merah dan terbentuk warna hijau untuk hasil positif mengandung steroid (Nugrahani *et al*, 2016).

3.6.5.7 Uji Tanin

Sebanyak 0,1 g ekstrak dilarutkan dengan 2 mL pelarut, kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan gelatin 1% dan dimasukkan 2-3 tetes larutan NaCl. Hasil positif jika terbentuk endapan (Saputri & Putri, 2017).

3.6.6 Analisis Kualitatif Senyawa Pada Ekstrak Umbi Bawang Dayak

(Eleutherine bulbosa (Urb.) Mill) Metode KLT

Fase diam KLT yang digunakan pada penelitian ini yaitu plat silika gel GF₂₅₄ dengan ukuran 8 x 2,5 cm yang diberi tanda batas dengan jarak 0,5 cm dari tepi atas dan bagian bawah plat.

Kromatografi dilakukan di dalam bejana yang telah dijenuhkan dengan fase gerak kloroform: metanol (8:2) kemudian ditotolkan ekstrak umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa (Urb.) Mill*) pada plat silika gel (Muthia *et al*, 2022). Plat dikeringkan setelah elusi berakhir kemudian dilakukan pengamatan di bawah sinar UV pada Panjang gelombang 254 dan 366 nm lalu disemprot penampak bercak universal H₂SO₄ 10% dan dipanaskan hingga plat mengeluarkan warna. Kemudian dilakukan analisis flavonoid pada plat yang berbeda dengan disemprot penampak bercak AlCl₃ 1% diamati pada sinar UV 366 nm. Penampak bercak AlCl₃ mengidentifikasi senyawa flavonoid dengan menghasilkan warna kuning, biru atau hijau yang diamati pada sinar UV 366 (Wagner & Bladt, 1996).

3.7 Pengolahan dan Analisa Data

Data dari hasil penelitian ini dianalisis secara deskriptif dengan menjabarkan hasil yang diperoleh dalam bentuk tabel dan gambar serta melakukan analisis dengan membandingkan dengan literatur. Untuk memastikan senyawa yang didapatkan dari hasil Rf dengan perhitungan sebagai berikut :

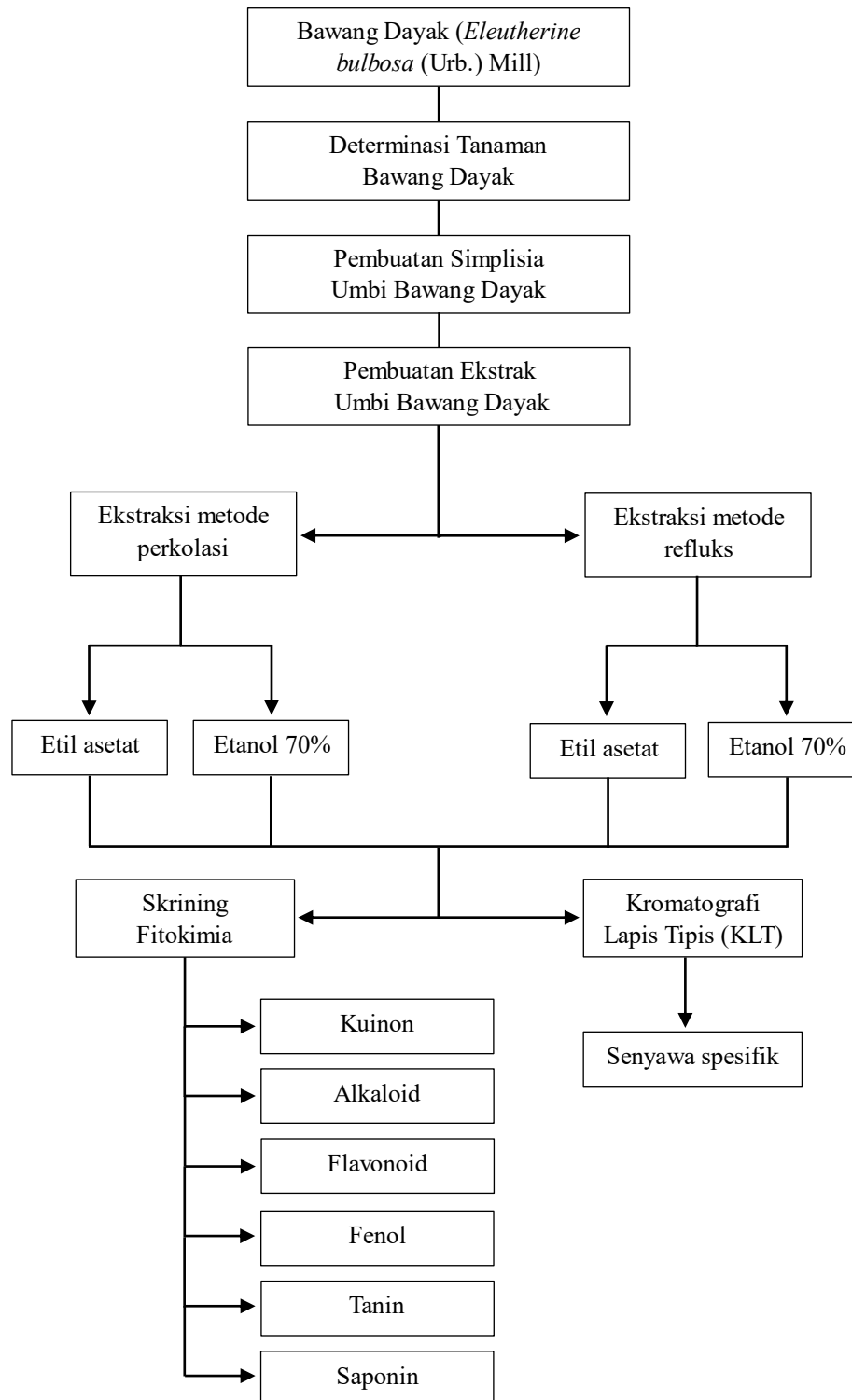
$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

Profil senyawa pada KLT yang didapatkan akan disemprot menggunakan penampak bercak spesifik sesuai dengan tabel 1. Kemudian diidentifikasi dengan sinar tampak maupun dengan sinar UV 254 dan UV 366 nm. Berikut tabel penampak bercak yang dapat digunakan:

Tabel 1. Penampak Bercak

Senyawa	Penampak Bercak Flavonoid	Penampak Bercak Universal	Hasil	Keterangan	Referensi
Flavonoid	AlCl ₃ 1%	H ₂ SO ₄ 10%	Warna kuning kehijauan	Dilihat di sinar UV 366	(Wagner & Bladt, 1996)

3.8 Kerangka Penelitian



Gambar 11 Kerangka Penelitian