

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan dan Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental Laboratorium yang bertujuan untuk mengidentifikasi kadar total senyawa fenolik yang terdapat pada ekstrak metanol batang Cawat Hanoman (*Tetrastigma* sp. (Miq.) Planch) yang diekstraksi secara maserasi dengan metode Spektrofotometri UV-Vis.

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 dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Borneo Lestari untuk melakukan proses penetapan kadar fenolik total ekstraksi batang Cawat Hanoman (*Tetrastigma* sp. (Miq.) Planch) dengan metode maserasi, penimbangan bahan, membuat larutan, serta melakukan pengujian Spektrofotometri UV-Vis.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tanaman Cawat Hanoman (*Tetrastigma* sp. (Miq.) Planch).

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah batang Cawat Hanoman (*Tetrastigma* sp. (Miq.) Planch).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini merupakan konsentrasi ekstrak dari masing-masing metode ekstraksi yaitu maserasi.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar total fenol ekstrak metanol batang Cawat Hanoman.

3.4.3 Variabel Tergantung

Preparasi sampel pada ekstrak Metanol Batang Cawat Hanoman (*Tetrastigma* sp. (Miq.) Planch) dengan penambahan Folin-Ciocalteu dan Na²CO³ 10% dalam penetapan kadar fenolik total.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Gunting, 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 (*Bauhinia aculeate* L.), metanol, *aquadest* (*Aqua DM Brataco*[®]), metanol p.a (*Emsure*[®]), reagen Folin-Ciocalteu (*Merck*[®]), aluminium foil (*Klinpak*[®]), lempeng silica gel GF₂₅₄, asam galat (*Merck*[®]), serbuk Na₂CO₃ (*Merck*[®]) dan FeCl₃ (*Merck*[®]).

3.6 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data Penelitian

3.6.1 Determinasi Sampel

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

3.6.2 Pembuatan Simplisia

Pengumpulan sampel batang Cawat Hanoman (*Tetrastigma* sp. (*Miq.*) *Planch*) dilakukan di pagi hari sekitar pada pukul 10.00 WITA di Desa Bunglai Kabupaten Banjar Kecamatan Aranio Provinsi Kalimantan selatan. Lalu melakukan sortasi basah untuk mengeliminasi kotoran atau debu yang menempel pada sampel, lalu dilakukan proses pencucian dengan air mengalir lalu tiriskan. Setelah proses pencucian selesai lalu selanjutnya dilakukan proses perajangan pada sampel dengan menggunakan mesin serut kayu (ketam atau planer) sampai menjadi bagian kecil atau serutan halus dan dilanjutkan dengan proses pengeringan dibawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam yang bertujuan untuk meminimalisir pengurangan kadar fenolik secara berlebih apabila di jemur langsung di atas matahari, proses penjemuran

berlangsung kira-kira sekitar 2 jam pada pukul 08.00-10.00 WITA sampai sampel benar-benar kering. Setelah kering lakukan sortasi kering untuk memastikan tidak terdapat kotoran yang masih menempel pada proses yang dilakukan sebelumnya (Nurviana, 2016). Kemudian lakukan penimbangan pada sampel kering dan catat bobot keringnya, haluskan sampel menggunakan blender dan ayak sampel menggunakan mesh 40 agar didapatkan hasil yang sempurna lalu timbang kembali hasil serbuk yang didapatkan. Langkah terakhir kemas hasil serbuk agar tidak terjadi kontaminasi oleh partikel lain, setelah itu lakukan perhitungan persen rendemen simplisia dengan menggunakan rumus:

$$\text{Persen Rendemen Simplisia} = \frac{\text{Bobot Simplisia Kering}}{\text{Bobot Simplisia Basah}} \times 100\%$$

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Metanol Batang Cawat Hanoman (*Tetrastigma* sp. (Miq.) Planch) Dengan Metode Maserasi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Sampel yang digunakan ditentukan dari perhitungan rendemen sebelumnya, serbuk simplisia yang diekstraksi dengan pelarut metanol menggunakan perbandingan (1:4). Sampel yang dilarutkan dengan metanol diaduk hingga larut sempurna. Ekstraksi dilakukan pada suhu kamar antara 20°C dan 25°C dan dibiarkan selama 24 jam, Proses ekstraksi didiamkan selama 24 jam dan diulangi beberapa kali (1 kali maserasi dan 2 kali remaserasi) sambil diaduk setiap 6 jam (Fadlilaturrahmah dkk., 2021). Setelah dilakukan semua tahapan maka saring hasil dari

maserasi tersebut dan pisahkan ekstrak cair dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator*. Lalu ekstrak dipekatkan menggunakan *waterbath* pada suhu 50°C sampai mendapatkan hasil ekstrak kental dengan penimbangan bobot tetap (Fuentes dkk., 2020; Cock, 2020; Muzdhalifah, 2022). Persen Rendemen Ekstrak dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Persen Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental}}{\text{Bobot simplisia yang di ekstraksi}} \times 100\%$$

3.6.4 Skrining Fitokimia Fenolik pada ekstrak metanol batang Cawat Hanoman

1. Uji Fenol

Sampel ekstrak metanol batang cawat hanoman ditimbang sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan pelarutnya, lalu tambahkan dengan 2 tetes larutan FeCl₃ 10%, hasil uji yang menunjukkan sampel positif mengandung senyawa fenol jika uji menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam menunjukkan positif mengandung senyawa fenol (Ramadhan dkk., 2020)

3.7 Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Batang Cawat Hanoman

3.7.1 Pembuatan Larutan Induk Asam Galat

Sebanyak 10 mg asam galat disiapkan lalu masukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan larutkan dalam 1 ml metanol p.a, kemudian diencerkan dengan air suling sampai tanda batas 10 ml, sehingga didapat hasil konsentration larutan induk 1000 ppm (Ikram dkk.,

2017). Kemudian larutan induk diencerkan menjadi 100 ppm dengan mengambil 1 ml dari konsentrasi 1000 ppm kemudian ditambahkan *aquadest* sampai tanda batas pada labu ukur 10 ml (Malik & Ahmad, 2014; Wahdaningsih dkk., 2017).

3.7.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebanyak 0,6ml. larutan asam galat 100 ppm ditambahkan 1 mL reagen Folin-Ciocalteu (diencerkan terlebih dahulu dengan air *aquadest* 1: 10), diamkan selama 5 menit, kemudian tambahkan 2 mL larutan Na_2CO_3 10%. Aduk hingga tercampur dan biarkan pada suhu kamar dalam kondisi gelap selama 50 hingga 55 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 600–800 nm (Ulya, 2020; Ramadhan & Forestryana, 2021; Muzdhalifah, 2022)

3.7.3 Penentuan *Operating Time*

Operating Time menggunakan hasil penelusuran literatur dari penelitian Wulandari dkk., (2020); Darwis, (2022); Putri & Khonsa, (2022); Rizki dkk., (2022); dan Saputri dkk., (2023) yang menyatakan nilai absorbansi stabil didapatkan pada menit ke-50-55.

3.7.4 Penentuan Kurva Baku Asam Galat

Larutan induk asam galat dari 1000 ppm yang telah diencerkan menjadi 500 ppm diambil sebanyak 0,8; 1,2; 1,6; 2 dan 2,4 ml, lalu masukkan pada masing-masing labu ukur yang berukuran 10 ml.

ditambahkan dengan metanol p.a 1ml, lalu diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas pada labu ukur 10 ml. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan hasil larutan sari kadar, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm dan 120 ppm (Ulya, 2020).

Larutan sari kadar yang telah dibuat masing-masing diambil 0,6 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, setelah itu ditambahkan 0,9 mL reagen Folin-Ciocalteu (sebelumnya telah diencerkan dengan aquadest 1:10) digojok. Diamkan selama 5 menit, masing-masing larutan ditambahkan Na_2CO_3 10% sebanyak 2 ml., digojok sampai homogen, lalu didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar dan dalam kondisi gelap. Pembacaan gelombang maksimum pada seri kadar menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui hasil yang didapat (Ramadhan & Forestryana, 2021).

3.7.5 Pengukuran Absorbansi Larutan Kurva Baku Asam Galat

Larutan seri yang telah disiapkan, ambil 0,6 mL masing-masing jenis masukkan ke dalam vial berwarna gelap, kemudian tambahkan 1 mL reagen Folin-Ciocalteu (sebelum diencerkan dengan air suling 1: 10), diamkan selama 5 menit, kemudian tambahkan 2 ml larutan Na_2CO_3 10%, gojok hingga rata, lalu biarkan selama 50-55 menit pada suhu kamar dan di tempat gelap. baca seri konsentrasi kadar dengan menggunakan spektroskopi UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Ulya, 2020; Ramadhan & Forestryana, 2021; Muzdhalifah, 2022)

3.7.6 Pengukuran Absorbansi Pada Penetapan Kadar Total Fenol Dari Ekstrak Metanol Batang Cawat Hanoman

Larutan sampel dengan konsentrasi 1000 ppm (10 mg sampel dilarutkan dalam 1 ml metanol) ambil 0,6 ml. Tambahkan 1 mL pereaksi Folin-Ciocalteu (sebelum diencerkan dengan aquades 1:10) biarkan selama 5 menit, lalu tambahkan 2 mL larutan Na₂CO₃ 10%, gojok hingga homogen, biarkan selama 50-55 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum (Ahmed dkk., 2019; Ulya, 2020; Ramadhan & Forestryana, 2021; Muzdhalifah, 2022)

3.8 Analisis Data

3.8.1 Penetapan Kadar Total

Nilai absorbansi larutan uji dimasukkan ke dalam regresi linier $y = bx + a$ larutan standar masing-masing (Salmia, 2016). Kandungan fenolik total dinyatakan dalam miligram ekuivalen asam galat per gram ekstraksi (mg GAE/g) (Ramadhan dkk., 2021). Kadar total fenolik dapat dihitung dengan rumus:

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

Keterangan:

C : Konsentersasi Asam Galat

V : Volume Fraksi

M : Berat Fraksi

Fp : Faktor Pengenceran

3.9 Kerangka Operasional



