

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk jenis penelitian eksperimental menggunakan ekstrak umbi hati tanah (*Angiopteris evecta*) dengan pelarut etanol 70%, umbi hati tanah (*Angiopteris evecta*) sebagai zat aktifnya dan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis untuk mengetahui kadar senyawa flavonoid.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Adapun waktu dan tempatnya yaitu, penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai dengan Mei 2022 di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Farmasi, Program Studi S-1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Borneo Lestari. Adapun rencana tujuan penggunaan laboratorium adalah sebagai berikut :

- a) Laboratorium Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan STIKES Borneo Lestari untuk melakukan proses ekstraksi pada umbi hati tanah (*Angiopteris evecta*).
- b) Laboratorium Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan STIKES Borneo Lestari untuk melakukan identifikasi senyawa pada ekstrak umbi hati tanah menggunakan kromatografi lapis tipis, serta untuk melakukan penetapan kadar total flavonoid dari ekstrak umbi hati tanah menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel terikat (Minarsih, 2019). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah umbi hati tanah yang diambil dari kota Palangkaraya provinsi Kalimantan Tengah.

3.3.2. Variabel terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat adanya variabel bebas (Minarsih, 2019). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar total flavonoid ekstrak umbi hati tanah (*Angiopteris evecta*).

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat

Alat Soklet (*Pyrex*[®]), batang pengaduk, *blender*, cawan penguap, *chamber*, gelas beker (*Pyrex*[®]), gelas ukur (*Pyrex*[®]), kuvet (*Quartz Cuvette*[®]), labu ukur (*Pyrex*[®]), mikropipet (*Dragon Lab*[®]), penangas air (*Memmert*[®]), pengayak, pipa kapiler, pipet tetes, pipet ukur, *rotary evaporator* (*IKFR 10*[®]), spektrofotometer UV-Vis (*PG Instrument*[®]), silika gel GF₂₅₄ (*Merck*[®]), timbangan analitik (*Fujitsu*[®]).

3.4.2. Bahan

Umbi hati tanah (*Angiopteris evecta*), Aluminium (III) klorida 10%, (AlCl_3) (*Merck*[®]), asam asetat *p.a* (*Merck*[®]), *aquadest*, kuersetin (*Sigma aldrich*[®]), Etanol *p.a* (*Merck*[®]), Kloroform (*Smart-lab*).

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Pengambilan Sampel

Tumbuhan umbi hati tanah (*Angiopteris evecta*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan hati tanah yang diperoleh dari penjual tumbuhan obat tradisional di Pasar Kahayan, Kota Palangkaraya, Kalimantan Tengah dimana tumbuhan Hati Tanah ini tumbuh di desa Tehang, kabupaten Gunung Mas, provinsi Kalimantan Tengah. Tumbuhan hati tanah yang diteliti adalah bagian umbi yang segar.

3.5.2. Determinasi Sampel

Determinasi tanaman mengikut pada penelitian Artati Kartikasari 2021, yang dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Pusat Penelitian Biologi Cibinong, Bogor.

3.5.3. Pembuatan Simplisia Umbi Hati Tanah

Sampel umbi hati tanah (*Angiopteris evecta*) dikumpulkan sebanyak 2 kg, disortasi basah untuk membersihkan dari kotoran-kotoran yang tertempel, lalu dicuci dengan air mengalir, selanjutnya dilakukan perajangan umbi dipotong dengan pisau hingga tipis, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari langsung hingga kering. Setelah kering dilakukan sortasi kering lalu dilakukan penyerbukan menggunakan *blender* sampai didapat serbuk halus kemudian serbuk diayak dengan pengayak 20 mesh, sebelum dilakukan ekstraksi sampel ditimbang dan dihitung rendemen simplisia dengan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot serbuk umbi hati tanah}}{\text{Bobot umbi hati tanah segar}} \times 100\%$$

3.5.4. Pembuatan Ekstrak Umbi Hati Tanah

Mengekstraksi umbi hati tanah dengan cara sokletasi. Ekstraksi diawali dengan mengekstraksi serbuk simplisia sebanyak 100 g yang dimasukkan ke dalam kertas saring lalu dimasukkan ke dalam alat sokhlet dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 1000 mL. Ekstraksi dilakukan hingga sampel tidak berwarna (bening). Ekstrak cair yang didapat dilakukan proses evaporasi menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak tersebut diuapkan di atas *waterbath* menggunakan cawan porselin hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental tersebut ditimbang dan dihitung rendemen ekstraknya dengan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$

Suhu pada sokhletasi juga perlu dijaga agar tak melebihi 77,1°C sehingga kandungan flavonoid pada ekstrak tidak rusak. Oleh karena itu, suhu yang digunakan pada ekstraksi yaitu pada rentang 69,1°C – 77,1°C. (Sudaryanto *et al*, 2016).

3.5.5. Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Ekstrak Etanol 70% Umbi Hati

Tanah (*Angiopteris evecta*) dengan Kromatografi Lapis Tipis

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan cara melarutkan 5 g ekstrak umbi hati tanah dengan etanol 70%, kemudian sampel ditotolkan pada plat KLT. Lempeng KLT dimasukkan kedalam *chamber* yang berisi eluen hasil optimasi dan dibiarkan hingga terelusi sempurna. Hasil positif flavonoid ditunjukkan jika bercak yang apabila disemprot dengan AlCl_3 5% akan berubah menjadi warna kuning atau jingga pada pengamatan secara sinar

tampak dan berflouresensi pada pengamatan dibawah sinar UV 254 nm (Sopiah *et al.*, 2019).

3.5.6. Penetapan Kadar Total Flavonoid

Penetapan kadar total flavonoid ekstrak umbi hati tanah (*Angiopteris evecta*) menggunakan kuersetin sebagai standar.

a) Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak

Ditimbang sebanyak 10 mg ekstrak umbi hati tanah (*Angiopteris evecta*), selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan ekstrak 1000 ppm (Ulya, 2020).

b) Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Diambil sebanyak 25 mg kuersetin kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas 25 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan induk 1000 ppm (Sukmawati *et al.*, 2018).

c) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Dipipet larutan induk kuersetin sebanyak 1 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas, agar konsentrasi yang terbentuk adalah 100 ppm. Larutan kuersetin 100 ppm dipipet sebanyak 0,5 mL, kemudian ditambahkan dengan 0,5 mL AlCl_3 10% dan 4 mL asam asetat 5%. Dilakukan pembacaan Absorbansi dengan Spektrofotometer UV- Vis pada panjang gelombang 400 sampai 600 nm (Ulya, 2020).

d) Penetapan *Operating Time* Kuersetin

Penentuan *operating time* dilakukan dengan mengambil sebanyak 0,5 mL larutan kuersetin 200 ppm dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu direaksikan dengan 0,5 mL AlCl_3 10%, dan ditambahkan 4 mL asam asetat 5% ke dalam larutan. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 2 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil dilakukan selama 60 menit, kemudian menentukan waktu *operating timenya* (Putri *et al.*, 2019).

e) Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Larutan induk 1000 ppm diambil sebanyak 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 mL dimasukkan pada masing masing labu ukur 10 mL dan ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas. Sehingga dihasilkan larutan seri kadar 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm (Sukmawati *et al.*, 2018).

Larutan seri kadar yang telah dibuat diambil masing masing sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan 0,5 mL AlCl_3 10% dan 4 mL asam asetat 5%. Didiamkan sesuai hasil optimasi selama 30 menit. Pembacaan seri kadar dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan adalah 420 nm.

f) Penetapan Kadar Total Flavonoid Dalam Ekstrak Umbi Hati Tanah
(*Angiopteris evecta*)

Dipipet sebanyak 0,5 mL larutan sampel 1000 ppm untuk direaksikan dengan 0,5 mL AlCl_3 10% dan 4 mL asam asetat 5%, lalu didiamkan selama 30 menit, selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada 420 nm panjang gelombang maksimum larutan kuersetin yang didapatkan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Sukmawati *et al.*, 2018). Kadar total flavonoid dinyatakan sebagai total kuersetin ekuivalen per 1 mg ekstrak ($\mu\text{gQE/mg}$) (Rosita *et al.*, 2017).

3.6. Analisis Data

Analisis data dengan persamaan regresi linier menggunakan program microsoft excel. Kadar total flavonoid didapat dengan cara memasukkan nilai absorbansi larutan uji kedalam regresi linier $y = bx + a$ larutan kuersetin, dimana y merupakan absorbansi larutan uji dan x konsentrasi total flavonoid yang terkandung di dalam ekstrak umbi hati tanah. Kadar total flavonoid ditunjukkan dengan dinyatakan sebagai total kuersetin ekuivalen per 1 mg ekstrak ($\mu\text{gQE/mg}$) (Rosita *et al.*, 2017).

Kadar total dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar total flavonoid} = \frac{C \times V \times Fp}{M}$$

Keterangan :

C : Konsentrasi Kuersetin
 V : Volume Ekstrak
 M : Berat Ekstrak
 Fp : Faktor Pengenceran
 (Salmia, 2016).

3.7. Kerangka Konsep

