

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kualitatif dan kuantitatif secara eksperimental di laboratorium yang bertujuan untuk menghitung kadar total fenolik dan flavonoid fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 80% daun bamban dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis

3.2 Variabel Penelitian

3.2.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 80% daun bamban (*Donax canniformis* K Scum.)

3.2.2 Variabel terkait

Variabel terkait pada penelitian ini adalah kadar fenolik dan flavonoid ekstrak etanol daun bamban (*Donax canniformis* K Scum.)

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas beker (*Pyrex*[®]), labu ukur (*Pyrex*[®]), cawan penguap, batang

pengaduk, tabung reaksi (*Pyrex*[®]), pipet tetes, kertas saring, neraca analitik (*Fujitsu*[®]), aluminium foil (*IKFR 10*[®]), spektrofotometer UV-Vis (*PGInstrument*[®]), penangas air (*Memmert*[®]), mikropipet (*Dragon Lab*[®]), pengayak (Standar Slieves), silika gel *GF₂₅₄* (*Merck*[®]), Vortex (*Bionex*[®]).

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bamban, aluminium (III) klorida ($AlCl_3$) (*Merck*[®]), asam asetat p.a (*Merck*[®]), asam galat (*Sigma aldrich*[®]), asam klorida (HCl) (*Merck*[®]), asam asetat (*Merck*[®]), aquadest, besi (III) klorida ($FeCl_3$) (*Merck*[®]), etil asetat (*Bramatachem*[®]), kuersetin (*Sigma aldrich*[®]), etanol p.a (*Merck*[®]), etanol teknis (*Bramatachem*[®]), n-heksana (*Bramatachem*[®]), natrium hidroksida (NaOH) (*Merck*[®]), natrium karbonat (Na_2CO_3) (*Merck*[®]), dan reagen folin ciocalteu (*Merck*[®]).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan daun Bamban (*Donax canniformis* K Scum.)

Sampel daun bamban diperoleh dari Martapura. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Desember. Daun bamban yang diambil merupakan daun bamban yang sudah matang (daun yang sudah terbuka) (Ihsan& Nazarni, 2017)

3.4.2 Determinasi Tumbuhan Bamban (*Donax canniformis* K Scum.)

Tumbuhan bamban dideterminasi untuk mengetahui spesies, taksonomi dan identifikasi dengan jelas dari tanaman bamban yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian dari tumbuhan tersebut (Diniatik, 2015). Determinasi dilakukan di Laboratorium FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru.

3.4.3 Pengolahan Simplisia Daun Bamban (*Donax canniformis* K Scum.)

Sampel daun bamban yang telah dikumpulkan, disortasi basah terlebih dahulu yang bertujuan untuk membersihkan dan menghilangkan dari kotoran dan benda asing yang menempel pada daun, kemudian dicuci dengan air yang mengalir, selanjutnya dilakukan perajangan pada daun agar mempercepat pengeringan. Pengeringan simplisia dikeringakan di dalam ruangan yang bebas dari sinar matahari selama empat hari hingga kering. Setelah kering di sortasi kering, kemudian diserbuk menggunakan *blender* hingga halus, serbuk yang telah halus diayak dengan menggunakan mesh 40, kemudian sampel diekstraksi (Ulya, 2020; Augustiya, 2020)

3.4.4 Ekstraksi Sampel

Daun bamban diekstraksi dengan metode maserasi, dengan perbandingan 1 : 5 antara serbuk dengan pelarut (Mulyawan *dkk*, 2021). sampel daun bamban di timbang sebanyak 200 g, kemudian dimasukkan kedalam benjana maserasi, kemudian tambahkan

pelarut etanol 80% sebanyak 1 liter hingga serbuk terbasahi merata dengan pelarut dan pastikan bagian bawah benjana terbasahi pelarut dengan sambil menggaduknya menggunakan batang pengaduk. Ekstraksi dilakukan selama 3 x 24 jam, pelarut yang telah dipakai diganti dengan pelarut baru setiap 1 x 24 jam. Larutan yang sudah didiamkan 1x 24 jam dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring *whatmant* no 1 sampai diperoleh filtratnya. Filtrat yang didapat tadi dimasukkan kedalam *rotary evaporator* menggunakan suhu 60°C. Penguapan menggunakan *waterbath* dengan suhu 60°C sampai diperoleh suatu ekstrak kental dengan bobot yang tetap (Sutomo, 2016).

3.4.5 Fraksinasi Sampel

Fraksinasi menggunakan perbandingan (1:5). Larutkan 8 g ekstrak etanol 80% daun bamban kental dengan 40 mL *aquadest*, kemudian ditambahkan dengan 40 mL larutan n-heksana masukkan ke dalam corong pisah. Kemudian gojog selama satu menit dan tunggu sampai terjadi pemisahan dua lapisan. Lakukan berulang dengan takaran pelarut yang sama hingga didapatkan fraksi n-heksana yang jernih. Pada lapisan atas akan terdiri dari fraksi n-heksana sedangkan pada lapisan bawah merupakan fraksi air karena sifat dari air polar dan n-heksana tidak polar (Khairiah *dkk.*, 2018; Ulya, 2020).

Fraksi air di ambil untuk melanjutkan fraksi etil asetat dengan menambahkan 40 mL etil asetat ke dalam fraksi air di dalam corong pisah. Lakukan hal yang sama seperti fraksi sebelumnya yaitu gojog corong pisah selama satu menit dan tunggu sampai terjadi pemisahan dua lapisan. Lakukan berulang dengan takaran pelarut yang sama hingga didapatkan fraksi etil asetat yang jernih. Timbang kemudian pekatkan dan uapkan fraksi etil asetat yang di dapat menggunakan penangas air. Setelah didapatkan fraksi etil asetat yang kental lakukan penimbangan hingga terdapat bobot tetap dan perhitungan rendemennya (Khairiah, 2018; Ulya, 2020)

3.4.6 Identifikasi Senyawa Fenolik dan Flavonoid Pada Fraksi Etil Asetat Dari Ekstrak Etanol 80% Daun Bambam (*Donax canniformis* K Scum.) Dengan Metode Skrining Fitokimia

a. Identifikasi Senyawa Fenolik

Larutan sampel dibuat dengan cara larutkan 10 mg fraksi etil asetat yang didapat sebelumnya dengan 10 mL etanol p.a Ambil sebanyak 1 mL larutan sampel masukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan $FeCl_3$ 3% sebanyak 1 mL. Jika hasil didapatkan berwarna hijau kehitaman menunjukkan sampel positif mengandung fenolik (Habibi *dkk.*, 2018; Ulya, 2020).

b. Identifikasi Senyawa Flavonoid

Larutan sampel dibuat dengan cara larutkan 10 mg fraksi etil asetat yang didapat sebelumnya dengan 10 mL etanol 80%. Ambil sebanyak 1 mL larutan sampel masukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan beberapa tetes larutan NaOH 20%. Jika hasil didapatkan berwarna coklat kekuningan muncul dan menghilang setelah ditambahkan HCl 2N, menunjukkan sampel positif mengandung flavonoid (Tanaya *dkk.*, 2015; Ulya, 2020).

Flavonoid juga dapat diuji menggunakan Mg dan HCl pekat, yaitu dengan penambahan Mg dan HCl pada fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 80% daun bambam. Jika hasil didapatkan berwarna merah, kuning atau jingga menunjukkan sampel positif mengandung flavonoid (Sulistyarini *dkk.*, 2020).

3.4.7 Identifikasi Senyawa Fenolik dan Flavonoid Pada Fraksi Etil Asetat Dari Ekstrak Etanol 80% Daun Bambam (*Donax canniformis* K Scum.) Dengan Kromatografi Lapis Tipis

Plat KLT diaktifkan sebelum digunakan dengan cara memanaskan plat KLT di dalam oven pada suhu 100-110°C selama waktu 30 menit. Kemudian larutkan 10 mg fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 80% dalam etanol p.a pada labu ukur 10 mL, setelah dilarutkan di totolkan pada plst KLT silika gel, Kemudian elusikan

plat KLT dengan eluen hasil optimasi yaitu n-heksana : etil asetat (1: 9), diamkan hingga terelusi sempurna (Marlina *dkk.*, 2016).

Plat KLT yang telah terelusi sempurna akan dihitung nilai Rf nya. Harga Rf dapat dijadikan bukti dalam mengidentifikasi senyawa. Bila identifikasi harga Rf memiliki nilai yang sama maka senyawa tersebut dapat dikatakan memiliki karakteristik yang sama atau mirip. Sedangkan, bila harga Rf nya berbeda, senyawa tersebut dapat dikatakan merupakan senyawa yang berbeda (Riza, 2016).

Plat KLT yang telah terelusi sempurna, dihitung nilai Rf. Jika nilai Rf besar berarti daya pisah zat yang dilakukan eluen maksimum, sedangkan jika nilai Rf kecil berarti daya pisah zat yang dilakukan eluen minimum (Samosir *dkk.*, 2018). Nilai Rf yang baik yaitu berada pada rentang 0,2-0,8 (Muttaqin *dkk.*, 2016). Setelah itu lakukan penyemprotan pada masing-masing plat KLT dengan reagen $FeCl_3$ 10% dan $AlCl_3$ 2%. Jika noda pada plat berwarna hitam setelah disemprot $FeCl_3$ maka positif mengandung fenolik, sedangkan jika noda pada plat berwarna kuning setelah $AlCl_3$ maka positif mengandung flavonoid (Marliani *dkk.*, 2016).

3.4.8 Tahapan Penetapan Kadar Totak Fenolik Fraksi Etil Asetat Dari Ekstrak Etanol 80% Daun Bamban (*Donax canniformis* K Scum.)

Penetapan kadar total fenolik fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 80% daun bamban menggunakan metode folin cicocalteau dan dengan asam galat sebagai standar.

a. Pembuatan Larutan Sampel

Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 80% daun bamban 10 mg dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a, kemudian didapatkan konsentrasi 1000 ppm sebagai larutan induk sampel. Untuk mendapatkan konsentrasi 500 ppm ambil 5 mL larutan induk sampel kemudian diencerkan etanol p.a ad 10 mL pada labu ukur 10 mL (Rezky, 2019).

b. Pembuatan Larutan Induk Asam Galat

Asam galat sebanyak 10 mg dilarutkan dengan etanol p.a ad 10 mL pada labu ukur 10 mL, diperoleh konsentrasi 1000 ppm sebagai larutan induk asam galat, untuk mendapatkan konsentrasi 100 ppm ambil 2,5 mL larutan induk asam galat 1000 ppm diencerkan dengan etanol p.a ad 25 mL pada labu ukur 25 mL (Wahdaningsih, 2017).

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Larutan induk asam galat 100 ppm sebanyak 6,5 mL diencerkan dengan etanol p.a ad 10 mL pada labu ukur 10 mL. Sehingga didapatkan konsentrasi 65 ppm (Wahdaningsih, 2017).

Larutan induk asam galat 65 ppm diambil sebanyak 0,6 mL ditambahkan 0,4 mL reagen folin ciocalteu, dan diamkan selama lima menit. Tahap selanjutnya tambahkan 3 mL larutan Na_2CO_3 7% lalu ditambahkan aquadest ad tanda batas pada labu ukur 10 mL. Homogenkan campuran dan diinkubasi selama 60-70 menit, kemudian diukur absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 650-800 nm (Saptari, 2019).

d. Penentuan *Operating Time* Asam Galat

Larutan induk asam galat 65 ppm diambil sebanyak 0,6 ditambahkan 0,4 mL reagen folin ciocalteu, dan diamkan selama lima menit. Kemudian tambahkan 3 mL larutan Na_2CO_3 7% lalu ditambahkan aquadest ad tanda batas pada labu ukur 10 mL. Gojog hingga campuran homogen dan diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimumnya dengan interval pada waktu setiap lima menit selama 70 menit (Saptari, 2019).

e. Pembuatan Larutan Standar Asam Galat

Larutan induk asam galat 100 ppm diambil sebanyak 2,5 mL ; 3,5 mL ; 4,5 mL ; 5,5 mL dan 6,5 mL yang telah di ambil masukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian di tambahkan dengan etanol p.a ad 10 mL pada masing-masing labu ukur 10

mL. Didapatkan larutan seri kadar 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm, 55 ppm, dan 65 ppm (Ulya, 2020).

f. Pembuatan Kurva Standar Asam Galat

Larutan kadar sari masing-masing diambil sebanyak 0,6 mL masukkan kedalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan 0,4 mL reagen folin ciocalteu, dan diamkan selama lima menit. Kemudian tambahkan 3 mL larutan Na_2CO_3 7% lalu ditambahkan aquadest ad tanda batas pada labu ukur 10 mL. Kemudian gojog kembali hingga homogen, dan didiamkan selama 60-70 menit pada suhu kamar dalam kondisi gelap. Pembacaan seri kadar dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang didapat (Paulinus *dkk.*, 2015; Pemungkas, 2016).

g. Penetapan Kadar Total Fenolik Dalam Ekstrak Etanol 80% Daun Bamban (*Donax canniformis* K Scum.)

Larutan sampel fraksi etil asetat dari ekstrak 80% daun bamban 500 ppm ditambahkan 0,4 mL reagen folin ciocalteu, dan diamkan selama lima menit. Kemudian tambahkan 3 mL larutan Na_2CO_3 7% lalu ditambahkan aquadest ad tanda batas pada labu ukur 10 mL. kemudian gojog hingga homogen, dan diinkubasi selama 60-70 menit. Ukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 750 nm (Wahdaningsih, 2017; Saptari, 2019; Rezky, 2019; Ulya, 2020). Hasil kadar fenolik

yang diperoleh dinyatakan sebagai mg ekuivalen asam galat (GAE)/g sampel (Abozed *et al.*, 2014).

3.4.9 Tahapan Penetapan Kadar Total Flavonoid Fraksi Etil Asetat Dari Ekstrak Etanol 80% Daun Bamban(*Donax canniformis* K Scum.)

Penetapan kadar total fenolik fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 80% daun bamban dan dengan kuersetin sebagai standar.

a. Pembuatan Larutan Sampel

Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 80% daun bamban 10 mg dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a, kemudian didapatkan konsentrasi 1000 ppm sebagai larutan induk sampel. Untuk mendapatkan konsentrasi 500 ppm ambil 5 mL larutan induk sampel kemudian diencerkan etanol p.a ad 10 mL pada labu ukur 10 mL (Rezky, 2019).

b. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Kuersetin sebanyak 10 mg dilarutkan dengan 10 mL etanol p.a, pada labu ukur 10 mL, diperoleh konsentrasi 1000 ppm sebagai larutan induk kuersetin (Sukmawati, 2018).

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Larutan induk kuersetin 1000 ppm sebanyak 1 mL diencerkan dengan etanol p.a 10 mL pada labu ukur 10 mL. Sehingga didapatkan konsentrasi 100 ppm. Ambil 1 mL larutan induk kuersetin 100 ppm, kemudian ditambahkan

dengan 1 mL $AlCl_3$ 10% dan 8 mL asam asetat 5% dan diinkubasi selama 22-30 menit. Lakukan pembacaan absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-500 nm (Fawwaz *dkk.*, 2017; Sukmawati *dkk.*, 2018; Ulya, 2020).

d. Penentuan *Operating Time* Kuersetin

Larutan induk kuersetin 1000 ppm sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL $AlCl_3$ 10% dan 8 mL asam asetat 5% dan diinkubasi selama 22-30 menit. Kemudian ukur absorbansi pada gelombang 400-500 nm dengan menggunakan spektrofotometer dengan interval waktu dua menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Sukmawati *dkk.*, 2018).

e. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Larutan induk kuersetin 1000 ppm diambil sebanyak 0,6 mL ; 0,7 mL ; 0,8 mL ; 0,9 mL ; dan 1 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian di tambahkan dengan etanol p.a pada masing-masing labu ukur hingga tanda batas. Sehingga didapatkan larutan seri kadar 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, 90 ppm dan 100 ppm (Sukmawati *dkk.*, 2018).

f. Pembuatan Kurva Standar Kuersetin

Larutan kadar seri masing-masing diambil sebanyak 1 mL masukkan kedalam labu ukur 10 mL kemudian tambahkan dengan 1 mL $AlCl_3$ 10% dan 8 mL asam asetat 5% pada setiap

labu ukur. Didiamkan selama *operating time* 22-30 menit pembacaan seri kadar dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 415 nm (Sukmawati *dkk.*, 2018; Estikawati & Lindawati, 2019; Ulya, 2020).

g. Penetapan Kadar Total Flavonoid Dalam Ekstrak Etanol 80% Daun Bamban (*Donax canniformis* K Scum.)

Larutan sampel fraksi etil asetat dari ekstrak 80% daun bamban 500 ppm diambil sebanyak 1 mL untuk direaksikan dengan dengan 1 mL $AlCl_3$ 10% dan 8 mL asam asetat 5%, kemudian diinkubasi selama 22-30 menit. Lakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimum 415 nm larutan kuersetin menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Sukmawati *dkk.*, 2018). Hasil kadar flavonoid yang diperoleh dinyatakan sebagai mg ekuivalen kuersetin (QE)/g sampel (Baba dan Malik, 2015).

3.5 Analisis Data

3.5.1 Analisis Data Kadar Total Fenolik Fraksi Etil Asetat Dari Ekstrak Etanol 80% Daun Bamban (*Donax canniformis* K Scum.)

Data kadar total fenolik di analisis menggunakan persamaan regresi linear. Penghitungan kadar fenolik dengan memasukkan data pada persamaan $y = bx - a$ dimana nilai y merupakan absorbansi

larutan fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 80% daun bamban dan nilai x merupakan konsentrasi total fenolik yang terkandung didalam fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 80% daun bamban (Pamungkas, 2016). Kadar total fenolik dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut: (Ready, 2016)

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

Keterangan:

C : Konsentrasi Asam Galat

V : Volume Fraksi

M : Berat Fraksi

Fp : Faktor pengenceran

Kadar fenolik yang diperoleh dinyatakan sebagai mg ekuivalen asam galat (GAE)/g sampel (Abozed et al., 2014).

3.5.2 Analisis Data kadar Total Flavonoid Fraksi Etil Asetat Dari Ekstrak Etanol 80% Daun Bamban(*Donax canniformis* K Scum.)

Data kadar total flavonoid di analisis menggunakan persamaan regresi linear. Penghitungan kadar flavonoid dengan memasukkan data pada persamaan $y = bx - a$ dimana nilai y merupakan absorbansi larutan fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 80% daun bamban dan nilai x merupakan konsentrasi total flavonoid yang terkandung didalam fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 80% daun bamban (Pamungkas, 2016). Kadar total flavonoid dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut: (Salmia, 2016)

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

Keterangan:

C : Konsentrasi Kuersetin

V : Volume Fraksi

M : Berat Fraksi

Fp : Faktor Pengencer

Hasil kadar flavonoid yang diperoleh dinyatakan sebagai mg ekuivalen quersetin (QE)/g sampel (Baba dan Malik, 2015).