

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi penelitian ini adalah daun pulutan (*Urena lobata* L.) yang terdapat di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan adalah daun pulutan segar dan berwarna hijau yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi pelarut etanol 96% dan etanol 70% terhadap kadar fenol total ekstrak daun pulutan (*Urena lobata* L.).

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perbandingan kadar total fenol dengan pengaruh konsentrasi etanol. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah waktu ekstraksi pada ekstrak daun pulutan dengan pelarut etanol 96% dan etanol 70%. Variabel terkontrol laboratorium dan penelitian. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun pulutan (*Urena lobata* L.).

##### **3. Definisi Operasional Variabel Utama**

Daun pulutan yang digunakan adalah daun pulutan yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi. Prinsip metode maserasi dengan merendam bahan tanaman (simplicia) di dalam pelarut etanol dengan konsentrasi 96% dan etanol konsentrasi 70% dalam wadah botol kaca yang tertutup pada suhu ruang.

Penetapan kadar fenol total dilakukan dengan cara metode spektrofotometri UV-Vis menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu 7,5%. Prinsip metode ini adalah membentuk senyawa kompleks berwarna biru yang disebabkan reaksi antar senyawa fenol dengan Folin-Ciocalteu yang dapat diukur dengan panjang gelombang 765 nm.

## C. Bahan dan Alat

### 1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk simplisia daun pulutan (*Urena lobata* L.), etanol 96%, etanol 70%, Methanol PA, aquadest, asam galat, reagen folin-ciocalteu 7,5%, NaOH 1%, FeCl<sub>3</sub> 0,1%, FeCl<sub>3</sub> pekat, Cloroform, metanol, n-heksan, etil asetat, HCL pekat, kertas saring.

### 2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis, *rotary evaporator*, 6 botol kaca, jar, pipet volume ukuran 0,5 mL; 1 mL; 2mL; 4mL; 5mL, timbangan analitik digital, pengaduk magnetik, waterbath, erlenmeyer, batang pengaduk, corong, kaca arloji, sendok ekstrak, kertas saring, tabung reaksi 10 mL, labu tentukur 25 mL, kuvet, lempeng silica gel GF<sub>254</sub> dan chember.

## D. Jalannya penelitian

### 1. Determinasi Tanaman

Pada proses determinasi dilakukan untuk menetapkan kebenaran pada sampel tanaman daun pulutan (*Urena lobata* L.) pada determinasi di buktikan oleh UPT-Laboratorium Universitas Setia Budi.

### 2. Pengambilan Bahan dan Pembuatan Simplisia

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pulutan yang berasal dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan berupa simplisia kering daun pulutan (*Urena lobata* L.).

Pembuatan serbuk daun pulutan yaitu dengan menimbang 13 kg daun pulutan segar dan dicuci, serta dikeringkan di oven dengan suhu 40°C. Setelah itu dilakukan dengan penghancuran daun pulutan yang kering kemudian diayak menggunakan mesh 60. Hasil serbuk disimpan pada wadah kering dan tertutup rapat.

### 3. Penetapan Susut Pengeringan

Menimbang seksama serbuk daun pulutan sebanyak 2 gram, masukkan ke dalam botol timbang yang telah ditara. Setelah itu, keringkan pada suhu 105°C, buka tutup botol timbang, masukan kedalam pengeringan hingga bobot konstan, sebelum ditimbang botol timbang diamkan di dalam desikator. Bobot konstan yaitu tidak lebih dari 0,25% atau 0,0005 gram (Kemenkes, 2017). Melakukan 3 kali replikasi.

#### 4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pulutan

Serbuk daun pulutan (*Urena lobata* L.) kering 100 gram dimasukkan dalam 6 botol gelap, 3 botol gelap ditambah etanol 96% sebanyak 1000 mL selanjutnya, ditambah etanol 70% sebanyak 1000 mL pada botol gelap lainnya. Lalu setelah ditimbang simplisia dimasukkan ke dalam botol kaca untuk dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi. Metode maserasi ini dilakukan dengan merendam simplisia dengan perbandingan serbuk dengan pelarut etanol 1:10. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Setelah direndam selama 24 jam langkah selanjutnya diserkai menggunakan kain flanel dan kertas saring sehingga diperoleh maserat (1). Ampas direndam kembali dengan setengah kali jumlah volume pelarut penyarian pertama (500 mL etanol 96% untuk botol gelap 1 dan 500 mL etanol 70% untuk benjana 2) selama 1 hari, disaring kembali dan diperoleh maserat (2). Maserat (1) dan (2) dikumpulkan menjadi satu kemudian dipisahkan dari residu dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental, lakukan 3 kali replikasi pada masing-masing konsentrasi etanol 96% dan etanol 70% (Kemenkes, 2017).

Hitung rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan. Perhitungan % rendemen dengan rumus:

$$\% = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

#### 5. Organoleptis

Identifikasi ekstrak kental daun pulutan dilakukan secara organoleptis berdasarkan bentuk, warna, dan bau dari ekstrak daun pulutan.

#### 6. Identifikasi Kandungan Kimia

**6.1 Identifikasi flavonoid.** Ekstrak 0,5 gram ekstrak etanol daun pulutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan serbuk Mg dan larutan HCl pekat. Adanya perubahan warna larutan menjadi merah bata menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Sopianti dan Dede, 2018).

**6.2 Identifikasi tannin.** Ditimbang 0,5 gram ekstrak etanol daun pulutan lalu di masukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 2 mL etanol 70% kocok, dan tambahkan 3 tetes FeCl<sub>3</sub>. Terbentuknya warna biru, biru tua, hijau kehitaman, biru hitam, atau hijau biru dan endapan menunjukkan adanya senyawa tanin (Mojab *et al.*, 2003)

**6.3 Identifikasi saponin.** Ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan air panas, didinginkan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang mantap setinggi 1-10 cm tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan asam klorida 2N menunjukkan adanya saponin (Muthmainnah B, 2017).

**6.4 Identifikasi tripterpenoid.** Ditimbang 0,5 gram ekstrak etanol daun pulutan lalu di masukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan n-heksan 2 mL dikocok. Lapisan n-heksan ditambahkan pereaksi Libermann-Burchard. Adanya perubahan warna menjadi merah kehitaman menunjukkan adanya senyawa triterpenoid (Hartini *et al.*, 2013)

## **7. Kromatografi lapis tipis (KLT)**

Larutkan ekstrak daun pulutan dalam pelarut etanol, kemudian ditotolkan pada plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari garis bawah. Plat KLT yang digunakan terbuat dari silika gel GF<sub>254</sub> dengan ukuran 20 cm x 20 cm. Selanjutnya dielusi menggunakan fase gerak yaitu chloroform: metanol dengan perbandingan 5:5. Setelah terelusi lempeng diangkat dan dikeringkan, diamati bercak pada lampu UV<sub>254</sub> nm dan UV<sub>366</sub> nm dengan penampak bercak besi (III) klorida (FeCl<sub>3</sub>). Hasil positif fenol jika noda berwarna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat. Analisis KLT menggunakan asam galat sebagai pembanding (Ayu *et al.*, 2019).

## **8. Pembuatan Larutan Uji**

Ekstrak etanol daun pulutan ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian larutkan dalam 25 mL etanol P dan Saring ke dalam labu tentukur 25 mL dan tambahkan etanol P ad tanda batas (Kemenkes, 2017).

## **9. Pengukuran Kandungan Fenol Total**

Pengukuran kandungan fenol total pada ekstrak dilakukan dengan menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu. Standar yang digunakan adalah asam galat. Dalam penetapan kandungan fenol total ini, dilakukan tiga langkah, yaitu penentuan waktu optimum dan panjang gelombang maksimum asam galat; pembuatan kurva kalibrasi standar asam galat; dan pengukuran serapan sampel. Sebelum dilakukan penetapan kadar fenol total, disiapkan terlebih dahulu larutan NaOH 1% yang akan digunakan.

### **9.1 Pembuatan Larutan Asam Galat Sebagai Standar.**

Ditimbang 10 mg asam galat dilarutkan dengan Etanol P ad 25 mL. Larutan dipipet 0,8; 1,2; 1,6; 2; dan 2,4 mL dimasukan labu tentukur 10

mL, sehingga dihasilkan konsentrasi larutan asam galat 80, 120, 160, 200, dan 240 ppm.

**9.2 Penyiapan Larutan NaOH 1%.** Ditimbang 1 gram serbuk NaOH kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades.

**9.3 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat.** Memipet 1 mL larutan asam galat 80 ppm ke dalam labu tentukur 10 mL lalu menambahkan 5 mL eceran Folin-Ciocalteu LP 7,5% , kemudian diamkan selama 8 menit lalu ditambahkan NaOH 1% sebanyak 4 mL dan diamkan selama 5 menit, setelah itu membaca absorbansi pada gelombang 400-850 nm, kemudian membuat grafik antara panjang gelombang dan absorbansi kemudian menetapkan  $\lambda$  maksimumnya.

**9.4 Penetapan *Operating Time* Asam Galat.** Memipet 1 mL larutan asam galat konsentrasi 240 ppm ke dalam labu tentukur 10 mL lalu menambahkan 5 mL eceran Folin-Ciocalteu LP 7,5%, kemudian diamkan selama 8 menit lalu ditambahkan NaOH 1% sebanyak 4 mL dan diamkan selama 5 menit, setelah itu baca dengan Panjang gelombang maksimum yang didapatkan selama 70 menit.

**9.5 Pembuatan Kurva Kalibrasi.** Memipet masing-masing 1 mL seri larutan pembanding asam galat ke dalam labu tentukur 10 mL lalu menambahkan 5 mL eceran Folin-Ciocalteu LP 7,5%, kemudian diamkan selama 8 menit lalu ditambahkan NaOH 1% sebanyak 4 mL dan diamkan selama *operating time* yang telah didapatkan, setelah itu baca dengan Panjang gelombang yang telah diketahui.

**9.6 Pengukuran Serapan Sampel.** Menimbang sampel 20 mg ekstrak daun pulutan, larutkan menggunakan pelarut ekstrak di dalam labu tentukur 25 mL, memipet 1 mL preparasi ekstrak, lalu tambahkan 5 mL eceran Folin-Ciocalteu LP 7,5% diamkan selama 8 menit, setelah itu ditambahkan NaOH 1% sebanyak 4 mL dan diamkan selama *operating time* yang telah didapatkan, setelah itu baca dengan Panjang gelombang yang telah diketahui

### E. Analisis Hasil

Hasil pengukuran absorbansi sampel yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung kadar fenol total setara dengan asam galat pada daun pulutan. Perhitungan menggunakan metode regresi linier dari pembuatan kurva kalibrasi antara konsentrasi dan serapan yang diperoleh dengan menggunakan  $\lambda$  maksimum yang diketahui.

$$Y = a + bx$$

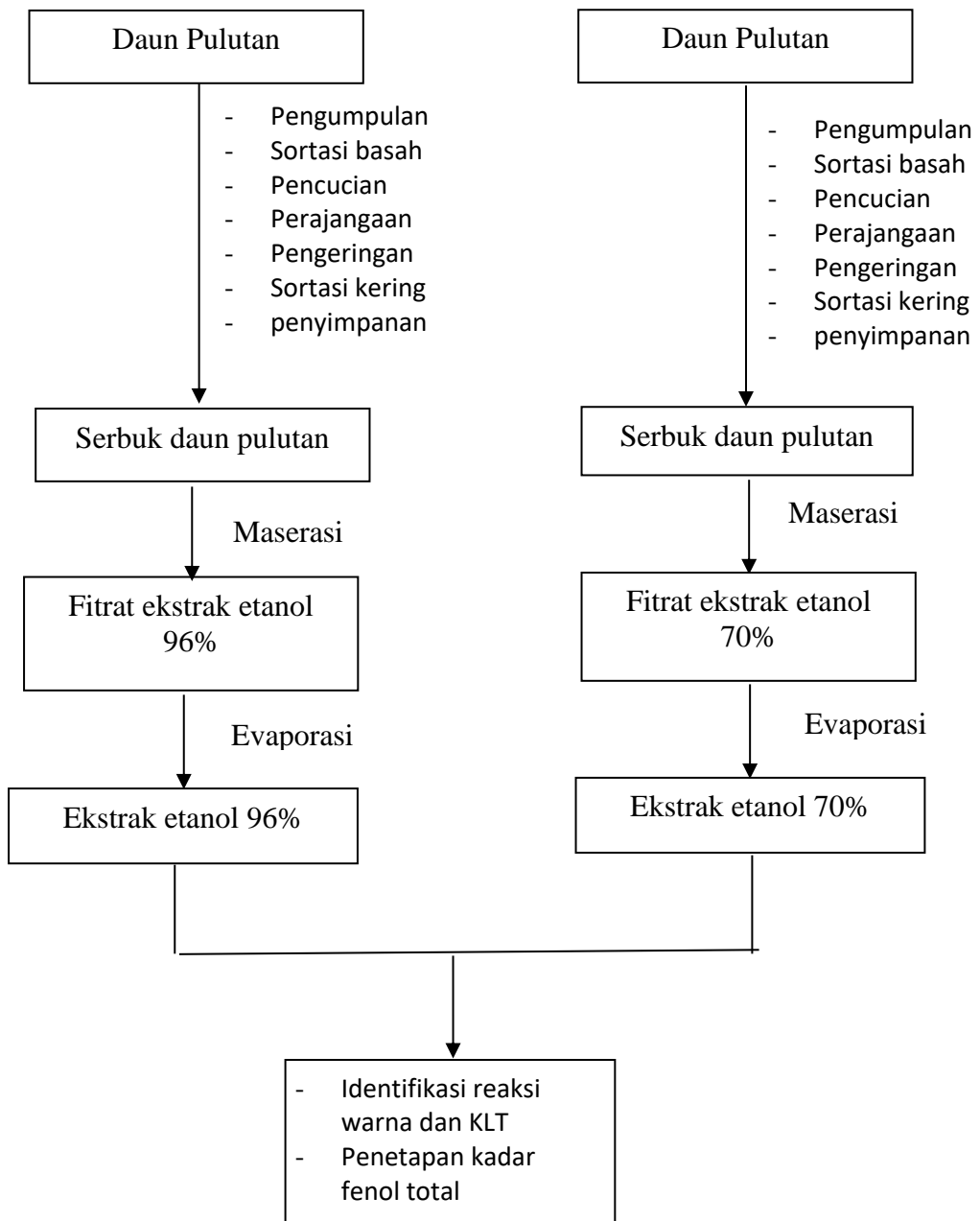
Keterangan:

Y = serapan yang diperoleh

X = konsentrasi (ppm)

Hasil perhitungan kadar dianalisis menggunakan uji statistik *Independent Sample Test*.

### F. Skema Penelitian



**Gambar 6. Skema penelitian**