

BAB II

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental. Proses ekstraksi daun katuk dilakukan dengan metode ekstraksi ultrasonik menggunakan pelarut etanol 70%. Kemudian ekstrak tersebut diuji parameter spesifik untuk melihat kualitas ekstrak etanol daun katuk dari dua tempat tumbuh.

1. Variabel bebas yaitu ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus* (L) Merr.).
2. Variabel tergantung yaitu parameter spesifik berupa identitas ekstrak, organoleptik ekstrak, senyawa terlarut dalam pelarut tertentu, kandungan kimia, dan profil KLT pada ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus* (L) Merr.) dari dua tempat tumbuh.
3. Variabel terkendali yaitu ekstraksi ultrasonik, kondisi lingkungan penelitian, suhu, dan pH.

B. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun katuk yang diperoleh dari budidaya pada usia 2-3 bulan disaat musim kemarau dengan pengambilan daun keseluruhan daun dari setiap pohon. Daun katuk diambil dari Jl. Mr Koesbiono Tjondro Wibowo Kecamatan Gunungpati Kabupaten Semarang, Jawa Tengah dan Desa Ngabean, kelurahan Maduoto, kecamatan kalikajar, Kabupaten Wonosobo Jawa tengah, etanol farmasetis 70% v/v,

kloroform LP, etanol 95% v/v, aquadest, metanol, n-heksan, etil asetat, H₂SO₄ 2M, pereaksi mayer, pereaksi dragendorf, pereaksi Folin-Ciocalteu, serbuk Mg, HCL pekat, FeCl₃ 1%, NaOH 1N, eter, amoniak, asam asetat anhidrat, silica gell F₂₅₄.

2. Alat Penelitian

Timbangan analitik (Wiggen Hauser), labu erlenmayer (Pyrex), gelas beker (Pyrex), ultrasonic cleaning bath (branson 2210), rotary vacum evaporator (yamto RE, 200), cawan penguap (Pyrex), kertas saring, labu ukur (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), rak tabung reaksi, batang pengaduk (Pyrex), kompor listrik (Maspion S-300 220V), pipet tetes, gelas ukur (Pyrex), corong, termometer, chamber, oven.

C. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Diponegoro, Semarang. Determinasi dilakukan dengan menggunakan kunci determinasi yang terdapat pada buku Flora of Java.

2. Pengumpulan Bahan

Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L) Merr.) diperoleh dari dua tempat tumbuh (dataran tinggi dan dataran rendah) yaitu dari Desa Ngabean, kelurahan Maduoto, kecamatan kalikajar, Kabupaten Wonosobo Jawa tengah dengan ketinggian 2.250 mdpl dan Jl. Mr Koesbiono Tjondro Wibowo Kecamatan Gunungpati Kabupaten Semarang, Jawa Tengah dengan

ketinggian 300 mdpl yang sudah di determinasi. Daun yang diambil daun yang masih segar dengan usia 2-3 bulan diambil pada saat musim kemarau dari keseluruhan daun dari setiap pohon.

3. Pembuatan Serbuk Simplisia

Penyiapan serbuk simplisia tanaman daun katuk yang dibutuhkan adalah 1.500 gram dari masing-masing tempat tumbuh. Pembuatan serbuk simplisia dilakukan dengan cara sortasi basah untuk memisahkan kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari daun. Kemudian dilakukan pencucian dengan air mengalir, setelah itu diangin-anginkan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 45° C (Depkes, 1985) sampai kering dengan tanda daun mudah hancur bila diremas dengan tangan.

Simplisia kering dibuat serbuk dengan cara diblender pada alat penyerbuk. Serbuk diukur kadar airnya dengan alat moisture balance. Persyaratan kadar air pada serbuk simplisia sebelum dilakukan proses penyarian yaitu kurang dari 10%. Serbuk sebanyak 1.500 gram dari masing-masing tempat tumbuh yang diperoleh kemudian disimpan dalam wadah kaca tertutup rapat dengan silica gel didalamnya.

4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun katuk

Serbuk daun katuk sejumlah 1.500 gram dimasukan kedalam gelas beker, selanjutnya ditambahkan pelarut etanol 70% sesuai dengan rasio bahan : pelarut yang akan digunakan yaitu 1:10 b/v dan ditutup dengan alumunium foil. Selanjutnya diekstraksi dengan Ultrasonik pada frekuensi 40 kHz selama 20 menit dalam suhu 40 ° C (Ardianti dan kurnadi, 2014). Selanjutnya hasil ekstraksi disaring dengan kertas saring menggunakan alat penyaring vakum.

Filtrat hasil penyaringan kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada tekanan 24 kPa (0,2369 atm) dan temperatur suhu <math><50^{\circ}</math> C sampai diperoleh ekstrak kental etanol. Alat rotary evaporator sebaiknya dibersihkan terlebih dahulu sebelum digunakan untuk memekatkan maserat dari simplisia yang berbeda. Hitung randemen setelah didapatkan ekstrak etanol simplisia, dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat}}{\text{Berat serbuk yang diekstrak}} \times 100\%$$

5. Penentuan Parameter Standardisasi Spesifik

Penentuan parameter standardisasi spesifik sebagai berikut (Depkes RI, 2000).

a. Identifikasi ekstrak

Deskripsi tata nama, nama lain tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan, dan nama Indonesia tumbuhan.

b. Penetapan organoleptik ekstrak

Penetapan organoleptik ekstrak meliputi, bentuk, warnarna, bau, dan rasa.

c. Penentuan kadar senyawa terlarut dalam pelarut tertentu

1) Kadar senyawa yang larut dalam air

Sejumlah 1 gram ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 20 mL air-kloroform LP (1:1) kemudian disaring. Diuapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan penguap, residu dipanaskan pada suhu 105° C hingga bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air terhadap berat ekstrak awal. Rumus perhitungan % senyawa larut etanol sebagai berikut :

$$\% \text{ Senyawa larut dalam etanol} = \frac{A_1 - A_0}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

A_1 = Bobot cawan + residu setelah pemanasan (g)

A_0 = Bobot cawan kosong (g)

B = Bobot sampel awal (g)

2) Kadar senyawa yang larut dalam etanol

Sejumlah 1 gram ekstrak dimaserasi dengan 25 mL etanol 96%, selama 24 jam dengan menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama. Kemudian didiamkan selama 18 jam dan disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol. Filtrat sebanyak 5 mL diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah dirata dengan cara didiamkan sampai pelarutnya menguap dan tersisa residunya, panaskan residu pada suhu 105⁰ C hingga bobot tetap. % senyawa larut etanol sebagai berikut :

$$\% \text{ Senyawa larut dalam etanol} = \frac{A_1 - A_0}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

A_1 = Bobot cawan + residu setelah pemanasan (g)

A_0 = Bobot cawan kosong (g)

B = Bobot sampel awal (g)

d. Identifikasi kandungan kimia ekstrak

Identifikasi kandungan kimia ekstrak sebagai berikut (Irsyad, 2013) :

1) Uji alkaloid

Sejumlah ekstrak ditambahkan 10 mL kloroform-amoniak, lalu disaring ke dalam tabung reaksi. Filtrat ditambahkan dengan beberapa tetes H₂SO₄ 2M dan dikocok sehingga terpisah dua lapisan. Lapisan asam yang terdapat dibagian atas dipipet ke dalam dua

tabung reaksi, setelah itu tambahkan serbuk NaCl dari masing-masing tabung dikocok lalu disaring. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan pereaksi Mayer (5 g KI dilarutkan dalam 90 mL air dan ditambahkan perlahan HgCl₂ sambil diaduk dan diencerkan hingga volume 100 mL) dan pereaksi Dragendorff (campuran Bi(NO₃)₂ 5H₂O dalam asam nitrat dan larutan KI). Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih dengan pereaksi Mayer dan endapan jingga sampai merah coklat dengan pereaksi Dragendorff.

2) Uji Flavonoid

Sejumlah ekstrak ditambah air secukupnya dan dipanaskan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan sedikit serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian larutan dikocok. Keberadaan flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning, jingga atau merah.

3) Uji Saponin

Sejumlah ekstrak dalam tabung reaksi ditambah air secukupnya dan dipanaskan selama 5 menit, setelah itu digojog kuat selama 10 detik ditambahkan beberapa tetes HCl pekat. Adanya saponin ditandai dengan terbentuknya busa atau buih yang stabil selama ± 15 menit setelah penambahan HCl.

4) Uji Tanin

Sejumlah ekstrak dalam tabung reaksi ditambah air secukupnya dan dipanaskan selama 5 menit, lalu disaring. Filtrat

dibagi menjadi dua bagian, tabung pertama ditambahkan pereaksi FeCl_3 1%. Adanya tanin ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan. Tabung kedua ditambahkan NaCl 10% kemudian digojog dan disaring, filtrat ditambahkan Gelatin. Adanya tanin ditandai adanya endapan yang terbentuk.

5) Uji triterpenoid atau steroid

Sejumlah ekstrak diekstraksi dengan eter dan fraksi yang larut dalam eter dipisahkan. Lapisan eter dipipet dan diuji dengan pereaksi Liebermann Buchard (asam asetat anhidrat : H_2SO_4 pekat = 3:1). Terbentuk cincin warna merah atau violet menunjukkan adanya triterpenoid dan terbentuk cincin warna hijau atau biru menunjukkan adanya steroid.

e. Profil KLT

Uji KLT dilakukan terhadap senyawa yang aktif dalam ekstrak etanol daun katuk yaitu :

1) Alkaloid

Identifikasi senyawa alkaloid menggunakan KLT dilakukan dengan cara sampel ekstrak etanol daun katuk dan pembanding (kafein) ditotolkan pada lempeng KLT Silika gel F_{254} . Lempeng yang sudah ditotolkan masukkan ke dalam chamber yang sudah jenuh dengan fase gerak Etil asetat-metanol-air (100 : 13,5 : 10 v/v). Ditunggu sampai lempeng KLT terelusi sampai batas (8 cm). Lempeng KLT dikeringkan setelah itu diamati pada sinar UV 254

nm, lalu disemprot dengan pereaksi Dragendorff dan diamati secara visibel (Depkes RI, 2008).

2) Flavonoid

Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan KLT dilakukan dengan cara sampel ekstrak etanol daun Katuk. Sampel dan pembanding (quersetin) ditotolkan pada lempeng silika gel. Lempeng KLT dimasukan ke dalam chamber yang telah jenuh dengan fase gerak kloroform : etilasetat (60:40) selanjutnya dielusi hingga batas (8 cm). Lempeng KLT dikeringkan lalu bercak diamati dibawah sinar UV 254 nm serta diuapi dengan uap amoniak dan diamati secara visibel (DepKesRI, 2008).

3) Tanin

Identifikasi senyawa tanin menggunakan KLT dilakukan dengan cara sampel ekstrak etanol daun katuk dan pembanding (asam galat) ditotolkan pada lempeng KLT Silika gel F₂₅₄. Lempeng yang sudah ditotolkan masukan ke dalam chamber yang sudah jenuh dengan fase gerak Toluene-Etil asetat (7:3 v/v). Ditunggu sampai lempeng KLT terelusi sampai batas (8cm). Lempeng KLT dikeringkan setelah itu diamati pada sinar UV 254 nm, lalu disemprot dengan pereaksi FeCl₃ dan diamati secara visibel (Depkes RI, 2008).

D. Analisis Data

Analisis dilakukan dengan menggunakan statistik uji t-tes independen dan dijabarkan secara deskriptif.

