

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah deskriptif dengan tujuan untuk mengetahui perbandingan kadar flavonoid total rebusan daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) basah dan kering dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

Tahapan penelitian ini meliputi determinasi tanaman, pembuatan ekstrak, analisis kualitatif flavonoid, penentuan kadar flavonoid total dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun binahong, sedangkan sampel yang digunakan yaitu 1000 gram daun binahong, meliputi 500 gram daun basah dan 500 gram daun binahong yang akan dikeringkan.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Farmakognosi dan laboratorium Instrumen Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan setelah dilakukan seminar proposal pada bulan Januari-Juni 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong sebagai variabel bebas dan kadar flavonoid total sebagai variabel terikat.

3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi Operasional	Parameter Uji	Alat ukur	Hasil Ukur
1.	Variabel bebas adalah daun binahong	Rebusan daun binahong basah dan kering	Rendemen	Timbangan analitik	Nominal
2.	Variabel terikat adalah kadar flavonoid total	Banyaknya kadar flavonoid pada rebusan daun binahong basah dan kering	Kadar flavonoid total	Spektrofotometri UV-Vis	Nominal

3.5 Instrumen Penelitian

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini wadah, perkamen, batang pengaduk, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, beaker glass, labu ukur, pipet volume, bola hisap, timbangan analitik, oven, hot plate, waterbath, termometer, spektrofotometri UV-Vis.

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu daun binahong kering dan basah, serbuk Mg, HCl 37%, etanol p.a, larutan kuersetin, AlCl₃ 10%, natrium asetat 1 M, aquades.

3.6 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman binahong dilakukan oleh UPT Materia Medica Batu.

3.7 Prosedur Kerja

3.7.1 Preparasi sampel

Dibutuhkan 1000 gram daun binahong untuk pembuatan daun basah dan daun kering.

1. Daun binahong basah

Daun binahong disortasi dari bahan-bahan pengotor. Dilakukan pencucian dengan air mengalir hingga bersih lalu ditiriskan dan diletakkan pada wadah yang sudah tersedia (MMB).

2. Daun binahong kering

Daun binahong disortasi dari bahan-bahan pengotor. Dilakukan pencucian dengan air mengalir hingga bersih lalu ditiriskan, kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C hingga kadar air menunjukkan $\leq 10\%$. Simplisia kemudian disortasi kering apabila masih terdapat kerikil, daun yang gosong, atau batang yang bukan simplisia, disimpan pada wadah yang kering tertutup rapat dalam ruangan yang terlindung dari cahaya matahari (MMB).

3.7.2 Prosedur ekstraksi

1. Daun binahong basah

Ditimbang 500 gram daun binahong lalu ditambahkan aquades sebanyak 1L, kemudian dipanaskan di dalam beaker glass diatas hot plate selama 5 menit pada suhu 90°C sambil sesekali diaduk (Dwi, 2016).

2. Simplisia daun binahong

Ditimbang simplisia lalu ditambahkan aquades sebanyak 900 mL, kemudian dipanaskan di dalam beaker glass diatas hot plate selama 5 menit pada suhu 90°C sambil sesekali diaduk (Dwi, 2016).

3.7.3 Analisis kualitatif kandungan flavonoid

Sebanyak 1 mg ekstrak ditambahkan dengan HCl 37%, kemudian ditambahkan 0.2 g bubuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah atau jingga (Marliana *et al.*, 2005).

3.7.4 Analisis kuantitatif kandungan flavonoid

3.7.4.1 Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Kurva standar dibuat dengan cara menghubungkan konsentrasi larutan standar kuersetin dengan hasil serapannya yang diperoleh dari pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 438 nm (Chang *et al.*, 2002).

3.7.4.2 Pembuatan kurva standar kuersetin

Sebanyak 0,2 mg kuersetin ditimbang dan dilarutkan dalam 20 mL etanol pa sebagai larutan standar kuersetin 100 ppm. Dibuat seri konsentrasi larutan standar kuersetin 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm. Sebanyak 2 mL larutan standar kuersetin ditambahkan 0,4 mL AlCl_3 10%, 0,4 mL natrium asetat 1 M dan 9,2 mL air suling. Diambil salah satu konsentrasi larutan standar, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 438 nm.

3.7.4.3 Penentuan waktu inkubasi optimum

Sebanyak 2 mL larutan standar kuersetin konsentasi 100 ppm, kemudian ditambahkan 0,4 mL AlCl_3 10%, 0,4 mL natrium asetat 1 M, aquades ad 10 mL. Kemudian dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu kamar. Penentuan waktu optimum yang stabil dilakukan beberapa kali percobaan yaitu pada 5 menit, 10 menit, 15 menit, 20 menit, 25 menit dan 30 menit.

3.7.4.4 Penetapan kadar flavonoid total

1. Daun binahong basah

Sebanyak 20 mg sampel ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL etanol pa kemudian disentrifuge sehingga diperoleh konsentrasi 2000 ppm. Sebanyak 2 mL sampel uji ditambahkan dengan 0,4 mL aluminium (III) klorida 10%, 0,4 mL

natrium asetat 1 M dan 9,2 mL air suling. Setelah diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum kuersetin 438 nm.

2. Simplisia daun binahong.

Sebanyak 20 mg sampel ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL etanol pa kemudian disentrifuge sehingga diperoleh konsentrasi 2000 ppm. Sebanyak 2 mL sampel uji ditambahkan dengan 0,4 mL aluminium (III) klorida 10%, 0,4 mL natrium asetat 1 M dan 9,2 mL air suling. Setelah diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum kuersetin 438 nm.

3.8 Analisis Data

Data yang diperoleh didapatkan dari absorbansi larutan pembanding kuersetin. Dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh persamaan regresi linear. Kadar dari senyawa dihitung dengan memasukkan kedalam persamaan regresi linear $y = ax + b$ dengan $y =$ absorbansi, $x =$ kadar dalam ppm (mg/L).

