

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian bersifat eksperimental yang dilakukan dengan melihat total kandungan serta perbedaan kandungan flavonoid total fraksi air, etil asetat dan n-Heksana ekstrak etanol daun adas.

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2022 – Maret 2022 di Laboratorium Kimia Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Sahid Surakarta.

3.2 Populasi dan Sampel

a. Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum Vulgare* mill)

b. Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah fraksi air, etil asetat dan n-Heksana dari ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum Vulgare* mill)

3.3 Alat dan Bahan

a. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas (*Pyrex*), cawan porselin (China), corong pisah (*Pyrex*), neraca analitik (Acis), baskom plastik (Lokal), toples 2500 L (*Pyrex*), blender (Maspion), oven, *waterbath* (memmert), pipet tetes (*Pyrex*), pipet volume (*Pyrex*), rak tabung reaksi (Lokal), spektrofotometer *UV-Vis* (*Gynesis*) dan *rotary evaporator* (*Bio base*).

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Alumunium foil (Klinpak), Aquadest (*Merck*), Etil asetat (*Merck*), Kuersetin (*Merck*), Kertas saring (Whatman), Serbuk Mg (*Merck*), Wash Benzene (*Merck*), Aseton (*Merck*), Asam Borat (Pudak), Asam Oksalat (*Merck*), Eter (*Merck*), HCl pekat (*Merck*), Amil Alkohol (*Merck*), Metanol, Ammonium Klorida (*Merck*), Natrium Asetat (*Merck*), Kalium Asetat (*Merck*), Daun adas (*Foeniculum Vulgare mill*), n-Heksana (*Merck*), Etanol 96% (*Merck*).

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah poin-poin yang akan menjadi karakteristik suatu penelitian (Ridha, 2017). Dalam penelitian ini ada dua jenis variabel:

a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dari fraksi air, etil asetat dan n-Heksana pada ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum Vulgare mill*)

b. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pemeriksaan kualitatif kandungan flavonoid dengan Uji *Taubek* serta Uji kuantitatif kandungan flavonoid total fraksi air, etil asetat dan n-Heksana pada ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum Vulgare mill*)

3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional yaitu definisi yang membatasi ruang lingkup atau variabel-variabel yang diteliti (Notoatmodjo, 2012). Definisi operasional pada penelitian ini adalah:

- a. Partisi adalah proses pemisahan untuk memperoleh komponen zat terlarut dari campurannya dalam padatan dengan menggunakan pelarut yang sesuai secara berulang hingga diperoleh ekstrak kental.
- b. Kandungan flavonoid total adalah besarnya kandungan flavonoid total fraksi air, etil asetat dan n-Heksana pada ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum Vulgare mill*) yang dinyatakan sebagai % b/b EK.
- c. Fraksi yang digunakan adalah air, etil asetat dan n-Heksana. Ekstrak etanol daun adas dipartisi dengan n-Heksana untuk memisahkan metabolit yang terkandung di dalamnya dengan metabolit yang lain. Ekstrak etanol daun adas dipartisi dengan n-Heksana dengan perbandingan 1:10 (satu bagian ekstrak etanol dengan 10 bagian n-Heksana). Fraksinasi yang kedua

menggunakan pelarut etil asetat. Fraksi etanol-air perlu mendapatkan perlakuan di atas *waterbath* selama 1-3 jam untuk mendapatkan fraksi yang lebih kental.

- d. Larutan standar atau larutan baku adalah suatu bahan dengan kemurnian tertentu yang digunakan sebagai pembanding untuk mendapatkan kadar suatu sampel.
- e. Konsentrasi larutan standar baku kuersetin yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25, 35, 45, 55, 65 dan 75 ppm dengan hasil serapan yang diperoleh dari pengukuran menggunakan spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang 429 nm dengan operating time di menit ke-28 sampai ke-32.
- f. *Lambda max* adalah panjang gelombang maksimum yang merupakan panjang gelombang di mana terjadi eksitasi elektronik yang memberikan absorbansi maksimum
- g. *Operating Time* adalah waktu yang dibutuhkan suatu senyawa untuk bereaksi dengan senyawa lain hingga terbentuk senyawa produk yang stabil.

3.6 Jalannya Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman untuk menetapkan kebenaran yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi pada sampel tanaman adas (*Foeniculum Vulgare* mill) secara makroskopis dan dengan acuan buku yang dibuktikan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

3.6.2 Penyiapan Simplisia

Penyiapan simplisia meliputi (Prasetyo, 2013):

a. Pengumpulan bahan baku

Pengumpulan bahan baku yang digunakan adalah bagian daun dari tanaman adas (*Foeniculum Vulgare* mill).

b. Sortasi basah

Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan cecairan (kotoran dan benda asing lain) dari bahan simplisia. Pembersihan simplisia dari tanah dapat mengurangi jumlah kontaminasi mikrobiologi.

c. Pencucian

Pencucian dilakukan dengan air mengalir dan menggunakan air bersih

d. Perajangan

Perajangan dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan dan penggilingan. Semakin tipis bahan yang dikeringkan, semakin cepat penguapan air yang dikandung, sehingga mempercepat waktu pengeringan.

e. Pengeringan

Pengeringan bertujuan agar simplisia tidak cepat rusak dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lebih lama. Dengan berkurangnya kadar air, maka reaksi enzimatik dapat dicegah sehingga penurunan mutu atau kerusakan simplisia dapat dihindari. Pengeringan menggunakan oven dapat dilakukan pada suhu 30°C – 90°C (terbaik 60 °C). Jika bahan aktif tidak tahan panas

atau mudah menguap maka pengeringan dilakukan dengan suhu serendah mungkin, misal 30°C – 45°C.

f. Sortasi kering

Tujuan sortasi adalah untuk memisahkan benda asing, seperti bagian tumbuhan yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang masih tertinggal pada simplisia kering yang telah di oven.

g. Pengepakan dan penyimpanan

Simplisia disimpan pada suhu yang sesuai dengan sifat dan ketahanan simplisia, serta dihindarkan dari faktor-faktor yang dapat mempengaruhi mutu simplisia.

3.6.3 Ekstraksi Sampel

Simplisia kering daun adas (serbuk) yang sebelumnya disortasi kering, dilakukan maserasi dengan cara merendam simplisia kering dengan etanol 96% (1:10) dalam maserator dengan cara maserasi pada suhu kamar selama 3 x 24 jam, lalu didiamkan selama 3 hari pada tempat yang terlindung dari cahaya matahari. Setelah 3 hari maserat disaring dan diperas. Hasil Maserasi yang didapat kemudian disaring dengan *corong buncher* dan *dirotary evaporator*, kemudian diuapkan di waterbath pada suhu 60°C sampai diperoleh konsistensi kental ekstrak daun adas (Wahyuni *et al.*, 2021).

3.6.4 Fraksinasi Sampel

Pembuatan fraksi dilakukan secara ekstraksi cair-cair (ECC) dengan menggunakan pelarut n-Heksana, etil asetat dan air. Sebanyak 10 gram ekstrak kental etanol daun adas dilarutkan dalam air sebanyak 25 mL. Selanjutnya dimasukkan kedalam corong pisah lalu ditambahkan 100 mL n-Heksana, dikocok secara perlahan-lahan selama 5 menit, setelah itu didiamkan hingga terjadi pemisahan antara ekstrak n-Heksana dan air. Ekstrak n-Heksana dipisahkan dengan lapisan air, kemudian ekstrak air dipartisi kembali dengan n-Heksana hingga 2 kali sampai larutan berwarna bening. Selanjutnya ekstrak air di partisi kembali menggunakan etil asetat dengan proses yang sama dengan n-Heksana. Ekstrak n-Heksana cair, ekstrak etil asetat cair dan ekstrak air diuapkan dengan *rotary evaporator* dan dikentalkan diatas *waterbath* sehingga diperoleh fraksi kental (Pratiwi *et al.*, 2019).

3.6.5 Pemeriksaan Kualitatif Flavonoid

Larutan uji dilakukan dengan mengambil sebanyak 100 mg ekstrak kental dipanaskan dalam 10 mL metanol selama 10 menit di penangas air. Saring dalam keadaan panas, kemudian filtrat diencerkan dengan 10 mL air. Dinginkan, tambahkan 5 mL *wash benzene*. Homogenkan dengan hati-hati dan biarkan dalam rak tabung selama beberapa menit sampai dua lapisan terbentuk. Ambil lapisan atas (metanol) dan kemudian diuapkan. Larutkan residu dalam 5 mL etil asetat dan saringlah (Ahwan, 2020).

Uji *Taubeek* dilakukan dengan menguapkan larutan uji 1 mL, basahi residu dengan aseton tambahkan sedikit serbuk asam borat dan serbuk asam oksalat, panaskan dengan hati-hati dalam penangas air, jangan terlalu panas. Campur residu yang dihasilkan dengan 2 mL eter. Amati dibawah UV 366 nm hasil positif apabila terbentuk fluoresensi kuning (Ahwan, 2020).

3.6.6 Analisis Kandungan Flavonoid Total

Analisis kandungan flavonoid total merujuk pada prosedur Farmakope Herbal Indonesia Edisi II dengan metode kalorimetri menggunakan pereaksi alumunium klorida dan kuersetin sebagai standar dan diukur secara spektrofotometri *UV-Vis*.

a. Pembuatan larutan standar *quersetin*

Ditimbang 2,5 mg baku kuersetin dan dilarutkan dalam 25 mL metanol p.a untuk 100 µg/mL (LIB I). Dipipet LIB I sebanyak 2,25 mL, dan dilarutkan dalam 5 mL metanol p.a untuk mendapatkan konsentrasi 45 µg/mL.

b. Penentuan panjang gelombang maksimum *quersetin*

Dipipet larutan standar kuersetin 45 ppm sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur. Ditambahkan 1,5 mL metanol p.a 0,1mL, larutan alumunium klorida 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M dan 2,8 mL aquadestilata. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Ukur panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada rentang 400 nm – 800 nm.

c. Penentuan waktu kerja (*Operating Time*)

Larutan standar kuersetin 45 ppm dipipet sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur. Ditambahkan 1,5 mL metanol p.a 0,1 mL larutan alumunium klorida 10% 0,1 mL natrium asetat 1M dan 2,8 mL aquadestilata. Ukur absorbansi larutan dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 429 nm setiap 1 menit dan diamati waktu larutan tersebut mulai menghasilkan absorbansi yang stabil, yang akan digunakan sebagai *operating time*.

d. Pembuatan kurva baku kuersetin

Dipipet larutan standar kuersetin 100 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 1,25; 1,75; 2,25; 2,75; 3,25; dan 3,75 mL dan dicukupkan dengan metanol p.a hingga 5 mL, sehingga dihasilkan konsentrasi 25; 35; 45; 55; 65 dan 75 $\mu\text{g/mL}$. Dipipet masing-masing konsentrasi larutan standar quersetin sebanyak 0,5 mL ke dalam vial. Ditambahkan 1,5 mL metanol p.a 0,1 mL larutan alumunium klorida 10% 0,1 mL natrium asetat 1 M dan 2,8 mL aquadestilata. Diinkubasi sesuai *operating time* pada suhu kamar dan ukur absorbansinya dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum.

e. Pembuatan larutan fraksi air, n-heksana dan etil asetat

Filtrat ditimbang sebanyak 50 mg, kemudian dilarutkan dengan 5 mL metanol p.a dalam gelas kimia 100 mL. Larutan diaduk menggunakan batang pengaduk, setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Gelas kimia dibilas dengan metanol p.a kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur hingga

tanda batas, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Setelah diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 1000 ppm, dilakukan pengenceran dengan cara dipipet 1 mL larutan sampel 1000 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan dengan metanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm, lalu dipipet sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan 1,5 mL metanol p.a 0,1 mL alumunium klorida 10%, 0,1 mL natrium asetat 1M, dan ditambahkan air suling 2,8 mL kemudian dikocok sampai homogen. Larutan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum kemudian dilakukan perhitungan kadar flavonoid (Permadi et al., 2015).

f. Pengukuran absorbansi fraksi air, n-heksana dan etil asetat

Dipipet sebanyak 0,5 mL larutan sampel ke dalam labu ukur. Ditambahkan 1,5 mL metanol p.a 0,1 ml larutan alumunium klorida 10% 0,1 mL natrium asetat 1M dan 2,8 mL aquadestilata. Diinkubasi berdasarkan *operating time* pada suhu kamar dan ukur absorbansinya dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 429 nm. Larutan sampel dibuat 3 kali pengulangan sehingga kandungan flavonoid yang diperoleh dinyatakan sebagai mg *ekuivalen* kuersetin/g ekstrak.

3.7 Analisis Data

1. Analisis Kualitatif Penetapan Kadar Flavonoid Total

Ekstrak kental dari daun adas dilakukan identifikasi mengandung senyawa flavonoid dengan uji *taubeek* yang ditandai dengan terbentuk fluoresensi kuning saat di amati dibawah UV 366.

2. Penetapan Kandungan Flavonoid Total

Kandungan flavonoid dihitung berdasarkan dari persamaan *regresi linier* kurva kalibrasi larutan standar kuersetin dari hasil pembacaan alat spektrofotometri *UV-VIS*. Nilai Absorbansi (ppm) dimasukkan ke dalam rumus regresi linier sebagai nilai y, sedangkan nilai x sebagai konsentrasi flavonoid yang ada pada larutan sampel kerja. Hasil dinyatakan secara triplo dan kandungan flavonoid dinyatakan dengan kesetaraan standar flavonoid menggunakan baku standar kuersetin (Rehni, 2019). Kandungan flavonoid dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$y = bx + a$$

Dengan:

$$y = \text{absorbansi}$$

$$x = \text{kadar}$$

$$a = \text{intersep}$$

$$b = \text{slope}$$

Perhitungan kandungan flavonoid total dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kandungan flavonoid total (\% b/b EK)} = \frac{Cf \times V \times FP}{M}$$

Dengan:

Cf = konsentrasi flavonoid total dari persamaan regresi ($\mu\text{g/mL}$)

V = volume sampel (L)

FP = faktor pengenceran

M = berat sampel (g)

3. Uji Statistik

Analisis data penelitian dilakukan dengan uji distribusi menggunakan Shapiro-Wilk dengan tujuan untuk melihat beda antara data yang diuji normalitasnya dengan data normal baku. Uji distribusi normal adalah data yang telah ditransformasikan ke dalam bentuk *Z-Score* dan diasumsikan normal. Setelah didapatkan distribusi data yang normal dilanjutkan uji homogenitas dengan *Levene test* dan uji *One Way ANOVA*. Uji homogenitas adalah suatu prosedur uji statistik yang dimaksudkan untuk memperlihatkan bahwa dua atau lebih kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki variansi yang sama dengan tujuan untuk mencari tahu apakah dari beberapa kelompok data penelitian memiliki variansi yang sama atau tidak (Usmadi, 2020). Penelitian dilanjutkan dengan *One Way ANOVA* dengan

tujuan agar diketahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan di antara hasil yang diperoleh. Perbedaan yang signifikan didefinisikan pada taraf kepercayaan 5% ($P < 0,05$). Apabila data yang diperoleh homogen dan terdistribusi normal selanjutnya diedit dan dikoding, dientri ke dalam file komputer dengan program *SPSS 15.0 for Windows*.