

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat eksperimental untuk mengetahui berapa kadar kandungan fenolik total dan perbedaan kandungan fenolik total fraksi N-heksan, etil asetat dan air ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum vulgare* mill). Penelitian ini dilakukan dengan metode partisi bertingkat di Laboratorium Kimia Farmasi, Prodi Farmasi, Fakultas Sains, Teknologi, dan Kesehatan Universitas Sahid Surakarta. Pada bulan Juli-Agustus 2022.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan subjek penelitian. Populasi pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum vulgare* mill). Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut. Sampel penelitian ini adalah fraksi N-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum vulgare* mill).

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: Daun adas (*Foeniculum vulgare mill*), N-Heksan (*Merck*), Etanol 96% (*Merck*), Etil Asetat, Aquadest, Kertas saring (*Whatman*), FeCl_3 (*Merck*), *Folin Ciocalteu* (*Merck*), Asam galat (*Merck*), Na_2CO_3 (*Merck*).

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu *Glassware* (*Pyrex*), Neraca analitik (*And*), Corong pisah (*Pyrex*), Aluminium foil (*Klinpak*), *Rotary Vacuum Evaporator* (*BioBase*), Spektrofotometer *Ultraviolet Visible* (*Gynesis*), *Waterbatch* (*Memert*), Cawan Porselin (*Lokal*), Toples 2500L (*Lokal*).

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 konsentrasi fraksi N-heksan, etil asetat dan air pada ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum vulgare mill*) dengan metode partisi bertingkat.

b. Variabel Terikat

Variabel Terikat pada penelitian ini adalah uji kualitatif (Uji Fenolik) dan uji kuantitatif (Uji kandungan Total Fenolik) fraksi N-heksan, etil asetat dan air 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 fenolik total adalah besarnya kandungan fenolik total fraksi N-heksan, etil asetat dan air pada ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum vulgare* mill) yang dinyatakan sebagai mg ekuivalen asam galat ekstrak.
- c. Fraksi yang digunakan adalah N-heksan, etil asetat, dan air. Ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum vulgare* mill) 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 1:5 (1 bagian ekstrak etanol dengan 5 bagian n-heksan). 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. Spektrofotometri *UV-Vis* memanfaatkan sinar dengan Panjang gelombang 180-380 nm untuk daerah UV dan 380-780 nm untuk daerah *visible* atau sinar tampak Prinsip kerja spektrofotometer menurut hukum

Lambert-Beer adalah seberkas sinar dilewatkan suatu larutan pada panjang gelombang tertentu, sehingga sinar tersebut sebagian ada yang diteruskan dan sebagian lainnya diserap oleh larutan. Pada spektrofotometer *UV-Vis*, zat diukur dalam bentuk larutan. Analit yang dapat diukur dengan spektrofotometer sinar tampak adalah analit berwarna atau yang dapat dibuat berwarna. Analit berwarna adalah analit yang memiliki sifat menyerap cahaya secara alami. Analit yang dibuat berwarna adalah analit yang tidak berwarna sehingga harus direaksikan dengan zat tertentu untuk membentuk senyawa yang menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu.

3.6 Jalannya Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Tahap pertama dalam penelitian ini yaitu melakukan determinasi tanaman untuk menetapkan kebenaran yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi pada tanaman secara makroskopis dan dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Setiabudi.

3.6.2 Penyiapan Simplisia

Penyiapan simplisia meliputi (Prasetyo, 2013):

a. Pengumpulan bahan baku

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

b. *Sortasi basah*

Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan cemaran (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 yaitu 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 Daun Adas (*Foeniculum vulgare mill*)

Simplisia kering daun adas (serbuk) yang sebelumnya disortasi kering, dilakukan maserasi dengan cara merendam simplisia kering sebanyak 1000 gr dengan etanol 96% (1:5) dalam maserator dengan cara maserasi pada suhu kamar selama 3 x 24 jam lalu didiamkan selama 3 hari di tempat yang terlindung dari cahaya matahari. Setelah 3 hari maserat disaring dan diperas. Hasil Maserasi yang didapat kemudian disaring dengan *corong buncher*, di *rotary evaporator* dan diuapkan di *waterbath* pada suhu 60 °C sampai diperoleh konsistensi kental ekstrak daun adas.

3.6.4 Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Adas (*Foeniculum vulgare mill*)

Fraksinasi ekstrak etanol daun adas dilakukan secara partisi dengan menggunakan corong pisah. Ekstrak etanol daun adas masing-masing sebanyak 30 g dilarutkan dalam 50 mL etanol kemudian dimasukkan kedalam corong pisah ditambahkan air 100 mL dan N-

heksan 100 mL digojog sampai terbentuk lapisan memisah diambil lapisan di bawah yaitu N-heksan, kemudian ditambah etil asetat 100 mL digojog hingga larutan memisah diambil larutan etil asetat, lalu diuapkan masing-masing larutan. Larutan penyari yang digunakan dalam penelitian ini adalah N-heksan, etil asetat dan air sehingga diperoleh fraksi N-heksan, etil asetat dan air dari daun adas tersebut. Larutan penyari diuapkan dengan *rotary evaporator*. Rendemen ditimbang bobot keringnya dan dicatat sebagai bobot fraksi-fraksi daun adas.

3.6.5 Identifikasi Polifenol

Fraksi kental N-heksan, etil asetat, dan air sebanyak 100 mg dipanaskan dalam 10 mL air selama 10 menit dalam *waterbath*. Saring dan diamkan dalam keadaan dingin tambahkan 3 tetes FeCl₃. Warna hijau menunjukkan polifenol (Ahwan & Qonitah, 2020).

3.6.6 Analisis Kandungan Fenolik Total

a. Pembuatan larutan induk asam galat

Sebanyak 50 mg asam galat dilarutkan dengan 0,5 mL etanol p.a dan diencerkan dengan akuades sampai 100 mL (Dewantara *et al*, 2021).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan menggunakan 150 µL larutan asam galat konsentrasi 15 ppm. Ditambahkan 1,5 mL *Folin Ciocalteu* (1:10), lalu larutan digojog dan didiamkan selama 3 menit. Setelah itu, ditambahkan 1,2 mL

larutan Na_2CO_3 7,5%, lalu larutan digojog hingga homogen dan larutan didiamkan pada suhu kamar pada *operating time (OT)* (Andriani dan Murtisiwi, 2018). Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 400 – 800 nm (Hapsari, dkk., 2018). Pada penelitian ini diperoleh panjang maksimal 633 nm.

c. Penentuan *Operating Time (OT)*

Penentuan *operating time (OT)* dilakukan dengan menambahkan 1,5 mL *Folin Ciocalteu* (1:10) pada 150 μL . Larutan asam galat konsentrasi 15 ppm. Selanjutnya, larutan digojog dan didiamkan selama 3 menit. Setelah itu, ditambahkan 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5%. Larutan digojog hingga homogen. Larutan diukur absorbansinya dalam rentang waktu 0-60 menit pada panjang gelombang maksimal yaitu 633 nm (Andriani dan Murtisiwi, 2018).

d. Pembuatan Kurva Baku Asam Galat

Pengukuran larutan standar asam galat dilakukan dengan membuat seri konsentrasi 3,75; 5,00; 6,25; 7,50 dan 8,75 ppm. Sebanyak 150 μL larutan diambil dan ditambahkan 1,5 mL *Folin Ciocalteu* (1:10), larutan digojog dan didiamkan selama 3 menit. Ditambahkan larutan Na_2CO_3 7,5% sebanyak 1,2 mL lalu larutan digojog hingga homogen. Kemudian larutan didiamkan selama *operating time (OT)* pada suhu ruangan. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum asam galat dan dibuat kurva

kalibrasi dengan persamaan regresi linier asam galat (Andriani dan Murtisiwi, 2018).

e. Penentuan Kandungan Fenolik Sampel

Fraksi N-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air masing-masing ditimbang sebanyak 100 mg dilarutkan sampai volume 100 mL dengan campuran etanol : *aquadest* (1:1). Larutan fraksi yang diperoleh dipipet 150 μ l dan ditambah 1,5 ml *Folin Ciocalteu* dan digojog. Didiamkan selama 3 menit, ditambahkan 1,2 ml Na_2CO_3 7,5 % dan didiamkan lagi pada range *operating time* pada suhu kamar. Absorbansi larutan ekstrak diukur dengan *spektrofotometer UV-Vis* pada panjang gelombang absorbansi maksimum 633 nm. Dilakukan 3 kali pengulangan (Andriani dan Murtisiwi, 2018).

3.6.7 Analisis Data

1. Analisis Kualitatif Fenolik Total

Fraksi kental N-heksan, etil asetat, dan air daun adas 100 mg di tambah 10 mL akuades dan disaring. Hasil filtrat kemudian ditambah FeCl_3 1% sebanyak 3 tetes. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna hijau tua (Dewantara *et al*, 2021).

2. Penetapan Kandungan Fenolik Total

Kandungan fenolik dihitung berdasarkan dari persamaan regresi linier kurva kalibrasi larutan standar asam galat dari hasil pembacaan alat spektrofotometri *UV-Vis*. Nilai Absorbansi (ppm) dimasukkan ke dalam rumus regresi linier sebagai nilai y,

sedangkan nilai x sebagai konsentrasi fenolik yang ada pada larutan sampel kerja. Hasil dinyatakan secara triplo dan kandungan fenolik dinyatakan dengan kesetaraan standar fenolik menggunakan baku standar asam galat (Rehni, 2019).

Kandungan fenolik dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$y = bx + a$$

Dengan:

$$y = \text{absorbansi}$$

$$x = \text{kadar}$$

$$a = \text{intersep}$$

$$b = \text{slop}$$

Perhitungan kandungan fenolik total dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kandungan fenolik total (mg GAE/g)} = \frac{C \times V \times fp}{g}$$

Keterangan:

C = Konsentrasi Fenolik (nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (ml)

fp = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g)

3. Analisis Statistik

Data kadar fenolik total tiap fraksi diujikan homogenitas (*Levene test*) dan normalitasnya (*Shapiro-wilk*), apabila data terdistribusi secara normal dan homogen termasuk uji parametris yaitu uji *One*

Way ANOVA, tetapi apabila tidak terdistribusi secara homogen dan normal yaitu non parametris akan dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan di bandingkan dengan uji *Mann Whitney*.

