

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian deskripsi kualitatif untuk mengetahui hasil skrining fitokimia dan identifikasi gugus fungsi serapan inframerah ekstrak etanol daun adas. Skrining fitokimia dilakukan dengan menggunakan beberapa reagen dengan jenis dan kadar yang disesuaikan dengan jenis uji fitokimia. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi: alkaloid, flavonoid, polifenol, saponin, tannin, antrakuinon dan steroid/terpenoid. Sedangkan identifikasi gugus fungsi ekstrak etanol daun adas dilakukan menggunakan spektrofotometer *infra red* (FT-IR).

3.2 Populasi Sampel

Daun tanaman adas didapatkan dari Cepogo Kabupaten Boyolali dan dipilih secara acak dengan memilih daun pada saat proses fotosintesis berlangsung. Daun yang dipilih dalam keadaan masih segar, berwarna hijau, tidak terlalu tua dan juga tidak terlalu muda.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Universitas Sahid Surakarta. Pelaksanaan ekstraksi dan identifikasi senyawa hasil ekstrak etanol daun adas dilakukan di laboratorium kimia farmasi Universitas Sahid Surakarta, identifikasi gugus fungsi dengan *fourier transform infra red* (FT-IR) dilakukan di Universitas Negeri Semarang. Penelitian dilakukan pada bulan

September sampai November 2020.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat dan Instrumen Penelitian

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut : Neraca analitik (ACIS), toples 2500 L (*pyrex*), kertas saring (lokal), mikropipet 5 μ L (dragon onemed), corong (*pyrex*), blender (maspion), beaker glass (*pyrex*), pipet tetes (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), cawan penguap (china), *waterbath* (memmert), baskom plastik (lokal), *rotary evaporator* (bio base), tabung reaksi (*pyrex*), rak tabung reaksi (lokal), pembakar spirtus (*pyrex*), penjepit tabung (lokal), Spektrofotometer infra merah (*Perkin Elmer Spectrum Version 10.4.00*), pompa hidrolis, alumunium foil, botol eluen, batang pengaduk (*pyrex*), gelas kimia 50 ml (*pyrex*), pinset (lokal), corong (*pyrex*).

3.4.2 Bahan

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : simplisia daun adas yang diambil di Kecamatan Cepogo Kabupaten Boyolali, HCl 1% (*Emsure*), alkohol 96% (Medika), pereaksi dragendorff, pereaksi mayer, methanol (Brataco), wash benzene (Brataco), etil asetat (Brataco), aseton (*Malinckrodt chemichal*), asam borat (Brataco), asam oksalat (Brataco), eter, FeCl₃ (Brataco), aquadest (Mitra medika), asam asetat anhidrat (*Emsure*), asam sulfat pekat (*Emsure*), benzena (*Emsure*), ammonia (Brataco) dan serbuk KBr.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian kali ini meliputi variabel tergantung, variabel bebas dan variabel terkontrol. Variabel tergantung merupakan titik pusat atau tujuan permasalahan yang merupakan kriteria dari penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun adas yang diuji kualitatif dengan metode skrining fitokimia dan spektrofotometri *infra red*. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dari daun adas. Variabel terkontrol merupakan variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kondisi pengukur atau peneliti, kondisi laboratorium, alat-alat laboratorium, metode uji, dan ekstraksi.

3.6 Definisi Operasional

Adapun Definisi Operasional pada penelitian ini sebagai berikut :

- a. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi sederhana yang paling banyak digunakan, khususnya untuk mengekstraksi senyawa yang lebih polar dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari atau pelarut.
- b. Identifikasi senyawa hasil ekstrak etanol daun adas, yaitu bentuk simplisia yang didapatkan dengan metode isolasi dan identifikasi tertentu. Uji kualitatif yang dilakukan antara lain : skrining fitokimia dan identifikasi senyawa dengan spektrofotometri inframerah.

- c. Skrining fitokimia merupakan metode yang digunakan untuk mempelajari komponen senyawa aktif yang terdapat pada sampel tanaman, yaitu mengenai struktur kimia, biosintesis, penyebaran baik secara alamiah atau fungsi biologisnya serta isolasi dan perbandingan komposisi senyawa kimia dari berbagai jenis tanaman.
- d. FT-IR (*Fourier Transform Infra Red*) merupakan salah satu instrumen yang menggunakan prinsip spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan *transformasi fourier* untuk deteksi dan analisis spektrumnya. Spektroskopi *infra red* digunakan untuk identifikasi senyawa organik karena spektrumnya sangat kompleks yang terdiri dari banyak puncak.

3.7 Jalannya Penelitian

3.7.1 Determinasi Tanaman Adas

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman untuk menetapkan kebenaran yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi pada tanaman secara makroskopis dan dengan acuan buku yang dibuktikan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu Kabupaten Karanganyar Provinsi Jawa Tengah.

3.7.2 Pengumpulan daun Adas

Daun tanaman adas yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Kecamatan Cepogo Kabupaten Boyolali.

3.7.3 Sortasi ekstrak

Sebanyak 1 kilogram daun adas disortasi kering (telah dibersihkan dari kotoran) dan disortasi basah (dicuci dengan air mengalir). Lalu dikeringkan tanpa sinar matahari langsung (dengan menggunakan oven). Simplisia daun adas kemudian dihaluskan dengan mesin penyerbuk dan diayak dengan *mesh* no 40 sehingga diperoleh serbuk daun adas yang mempunyai derajat kehalusan yang relatif homogen. Pembuatan serbuk ini bertujuan untuk memperluas permukaan partikel bahan yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung efektif, kemudian disimpan dalam toples dan sampel siap diekstraksi.

3.7.4 Ekstraksi sampel

Serbuk daun adas kering yang sudah disortasi direndam dengan etanol 96% sebanyak 1:10 dalam maserator dengan cara maserasi pada suhu kamar selama 3 x 24 jam. Diaduk-aduk tiap 1 jam, lalu didiamkan selama 3 hari pada tempat yang terlindung dari cahaya matahari. Setelah 3 hari maserat disaring dan diperas. Maserat yang didapat kemudian disaring dengan corong buchner dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* lalu diuapkan di *waterbath* pada suhu 60°C hingga diperoleh konsistensi kental ekstrak etanol daun adas.

Rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan. Pelarut etanol 96% lebih awet dalam penyimpanan

karena mengandung kadar air yang sedikit sehingga lebih kecil kemungkinan untuk tumbuh bakteri (Susanty dan Bachmid, 2016).

Proses ekstraksi dengan teknik maserasi dilakukan dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu ruang dan tidak perlu pemanasan sehingga kecil kemungkinan bahan alam menjadi rusak atau terurai (Istiqomah, 2013).

Adapun perhitungan rendemen sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang di dapat} \times 100\%}{\text{Bobot serbuk simplisia yang di ekstraksi}}$$

3.7.5 Skrining Fitokimia

a. Identifikasi Alkaloid

100 mg ekstrak kental dipanaskan dalam tabung 10 mL dengan menambahkan HCl 1% (7-8 mL) selama 30 menit dalam *waterbath*. Bagian cairan diperoleh dengan cara menyaring atau hanya menuangkan (jika memungkinkan). Destilat dibagi setengahnya dalam volume yang sama, tabung A dan B. Tabung A dibagi menjadi dua, larutan A-1 ditambahkan 3 tetes Dragendorff positif alkaloid apabila terbentuk endapan putih putih dan larutan A-2 ditambahkan dengan 3 tetes pereaksi Mayer hasil positif jika terbentuk endapan merah jingga (Ahwan, 2020).

b. Identifikasi Flavonoid

Larutan uji : 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 Taubeck : uapkan 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 366nm hasil positif apabila terbentuk fluoresensi kuning (Ahwan, 2020).

c. Identifikasi Polifenol

100 mg serbuk simplisia dipanaskan dalam 10 mL air selama 10 menit dalam *waterbath*. Saring dan diamkan dalam keadaan dingin tambahkan 3 tetes FeCl_3 . Terbentuknya warna hijau pada larutan menunjukkan positif mengandung polifenol (Ahwan, 2020).

d. Identifikasi Saponin

Sebanyak 100 mg ekstrak kental ditambah 10 mL air panas didihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat yang dihasilkan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kocok vertikal selama 10 detik, diamkan selama 10 menit. Terbentuk nya busa yang stabil dalam tabung setelah penambahan 1 tetes HCl 1% menunjukkan adanya senyawa golongan saponin (Ahwan, 2020).

e. Identifikasi Tanin

Sebanyak 100 mg ekstrak kental dan 10 mL air, didihkan selama 14 menit, setelah dingin, saring dan filtrat dibagi dua. Ke dalam filtrat yang pertama ditambahkan larutan besi (III) klorida 1%. Positif mengandung senyawa golongan tanin apabila terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman (Ahwan, 2020).

f. Identifikasi Antrakuinon

Identifikasi antrakuinon dilakukan dengan uji *Brontrager* dengan cara melarutkan 2 mL sampel dengan 10 mL aquadest kemudian disaring. Filtrat yang dihasilkan diekstraksi dengan 5 mL benzena. Hasil ekstrak dibagi menjadi 2 bagian, A dan B. Filtrat A digunakan sebagai blangko dan filtrat B ditambahkan 5 mL ammonia kemudian dikocok, hasil positif bila terbentuk warna merah (Marlina,dkk., 2005).

g. Identifikasi Steroid dan Terpenoid

Sebanyak 100 mg ekstrak kental dimaserasi dengan 10 mL eter selama 2 jam, saring kemudian diambil filtratnya. Diambil sebanyak 5 mL dari filtrat tersebut, uapkan dalam cawan penguap hingga diperoleh residu. Selanjutnya residu tersebut ditambahkan dengan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna merah atau hijau menunjukkan adanya senyawa golongan steroid/ triterpenoid (Ahwan, 2020).

3.7.6 Identifikasi dengan *Fourier Transform Infra Red* (FT-IR)

Identifikasi menggunakan spektrofotometer *infra red* (IR), yaitu dilakukan pembuatan pelet dengan memasukkan 50 mg sampel yang telah dicampur dengan KBr ke dalam *disc* pencetak pelet kemudian ditekan menggunakan pompa hidrolis, ketebalan diatur sesuai skala pada tuas pompa hidrolisnya. Langkah selanjutnya dilakukan pengepresan dengan variasi waktu penekanan. Setelah itu buka tuas pompa dan ambil *disc pellet* sampel. Lakukan penerawangan tingkat kejernihan pelet yang dihasilkan, jika pelet sampel dengan KBr yang dihasilkan tidak jernih, maka dilakukan pengulangan proses preparasi pembuatan pelet sampel.

Pengujian spektrum dilakukan sesuai dengan standar operasional prosedur alat Spektrofotometer *infra red Perkin Elmer* dalam rentang frekuensi 4000 cm^{-1} sampai 400 cm^{-1} , sebanyak 100 kali pembacaan dengan resolusi 8 cm^{-1} . Spektrum yang dihasilkan dianalisis menggunakan perangkat lunak Spektrum *Software FT-IR Perkin Elmer*.

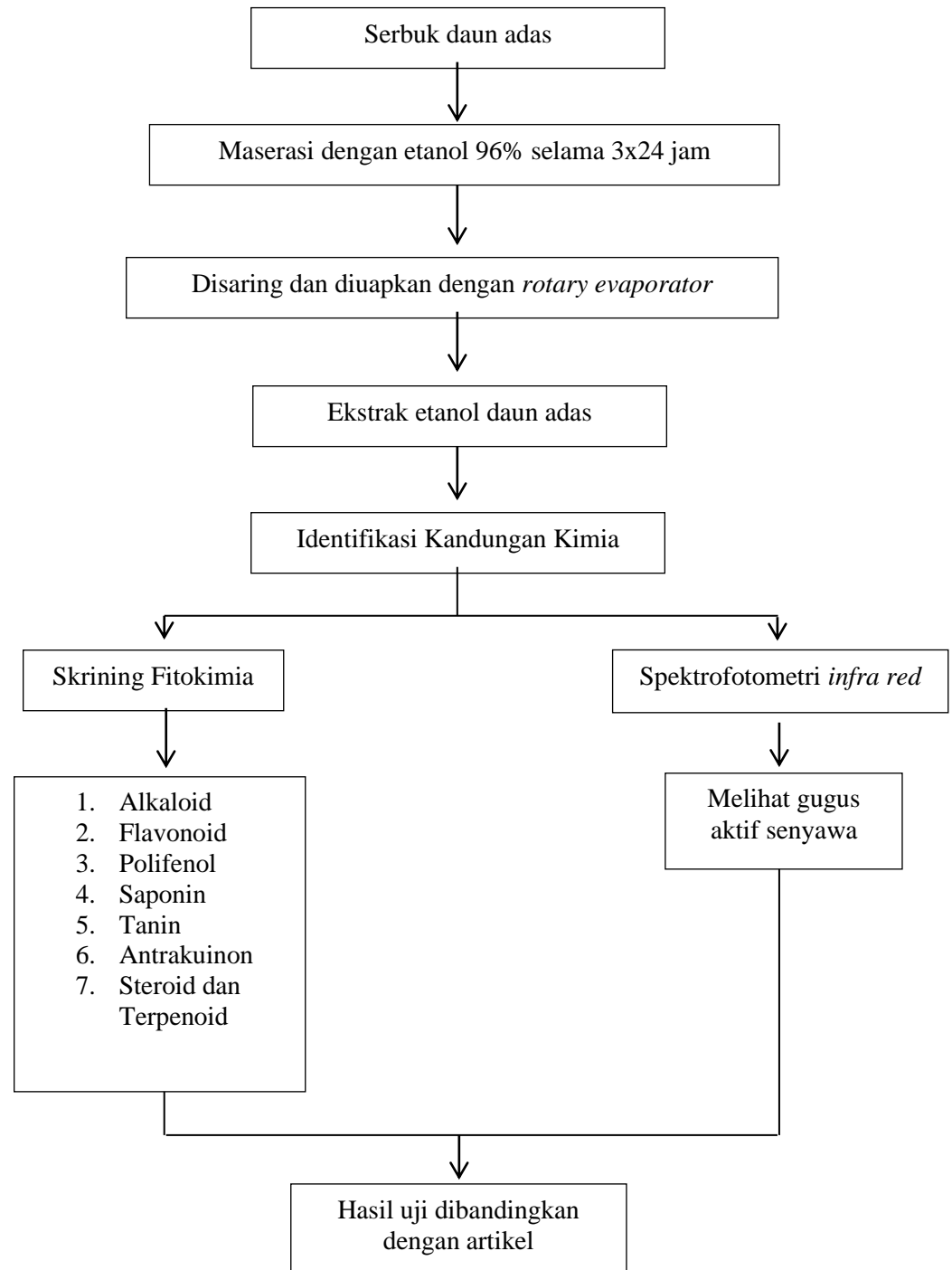
Spektrum yang dihasilkan dari pembacaan spektrofotometer *infra red* (FT-IR) selanjutnya untuk menentukan gugus fungsi yang terdapat pada sampel protein dilakukan dengan menginterpretasi meliputi bilangan gelombang dan persen transmitansinya. Hasil dari pembacaan berbagai variasi dibandingkan untuk melihat optimasi hasil pengukuran dengan variasi perbandingan komposisi pelet sampel-KBr, ketebalan pelet sampel dan waktu pengepresan terhadap spektrum vibrasi yang dihasilkan menggunakan spektrofotometer *infra red* (FT-IR) sehingga

didapatkan spektrum yang terbaik pada pengukuran vibrasi molekul menggunakan spektrofotometri *infra red* (FT-IR) (Dachriyanus, 2004).

3.6 Analisis Data

Kandungan senyawa diperoleh berdasarkan hasil analisis kualitatif skrining fitokimia dengan mereaksikan reagen tertentu dan identifikasi gugus fungsi senyawa organik ditentukan berdasarkan hasil bilangan gelombang dari spektrum *infra red* (FT-IR) kemudian dibandingkan secara deskriptif dengan gugus fungsi dari senyawa kimia hasil penelitian Badgular, 2014.

3.7 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 : Kerangka Konsep