

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis Penelitian deskriptif adalah suatu bentuk penelitian yang ditujukan untuk mendeskripsikan fenomena-fenomena yang ada, baik fenomena alamiah maupun fenomena buatan manusia. Fenomena itu bisa berupa bentuk, aktivitas, karakteristik, perubahan, hubungan, kesamaan, dan perbedaan antara fenomena yang satu dengan fenomena lainnya (Sukmadinata, 2006). Penelitian ini dapat dilakukan dengan beberapa tahap yaitu: Tahap Persiapan, tahap persiapan dalam penelitian ini adalah penentuan sampel, persiapan alat dan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian, penyusunan prosedur penelitian, dan konfirmasi kesiapan laboratorium penelitian. Tahap Pelaksanaan, tahap pelaksanaan dalam penelitian ini meliputi: pembuatan simplisia, melakukan ekstraksi, uji skrining fitokimia dengan Metode yang digunakan yaitu KLT (kromatografi lapis tipis). Tahap Akhir, tahap akhir dalam penelitian ini yaitu melakukan analisa data yang sudah diperoleh dalam pengujian skrining fitokimia jamu iboe lancar haid.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi merupakan keseluruhan dari objek yang akan diteliti. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamu lancar haid merk "X". Sampel merupakan bagian dari populasi yang diteliti. Sampel yang digunakan adalah jamu lancar haid merk "X". dengan nomer batch tertentu.

3.3 Lokasi dan Waktu penelitian

Penelitian ini berlokasi di Laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang, pada Februari 2019 sampai Mei 2019.

3.4 Definisi operasional variabel

Definisi operasional variabel pada penelitian ini digunakan untuk memberikan penjelasan terhadap variabel dalam penelitian. Beberapa definisi operasional variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi operasional variabel

Definisi Operasional Variabel	Variabel	Alat Ukur	Hasil	Skala Ukur
Analisis profil fitokimia metabolit sekunder ekstrak etanol rimpang kunyit, asam jawa, rimpang kencur, kulit kayu manis, kapulaga dalam jamu lancar haid merk "X" dengan metode KLT	Identifikasi kandungan metabolit sekunder ekstrak etanol rimpang kunyit, asam jawa, rimpang kencur, kulit kayu manis, kapulaga dalam jamu lancar haid merk "X" dengan metode KLT	KLT	Bercak noda dan nilai R_f dari hasil pemisahan	FHI

3.5 Alat dan Bahan

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian Skrining Fitokimia obat diabet dengan Metode KLT adalah sebagai berikut:

3.5.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan yaitu pipet tetes, neraca elektrik, erlenmayer, corong kaca, batang pengaduk, kertas saring, corong, beaker glass, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, timbangan analitik, bejana pengembang, kain kasa steril, UV 254 (mascotte), UV 366 nm (kozure).

3.5.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan sampel jamu lancar haid merk x, ekstrak rimpang kunyit, rimpang kencur, kapulaga, kulit kayu manis, asam jawa, H_2SO_4 , Na_2SO_4 , amonia pekat 28%, $HgCl_2$, KI, logam Mg, etanol 70%, $FeCl_3$, aquadest, Mg, HCl pekat, $FeCl_3$, KCL, Astonitril, Kloroform, Metanol, Aquadest, Aseton, Asam formiat.

3.6 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian ini dilakukan dengan langkah pengambilan bahan rimpang kunyit, rimpang kencur, kapulaga, kulit kayu manis, asam jawa di Kota Batu, sedangkan jamu iboe lancar haid dari PT jamu iboe, Sidoarjo. Selanjutnya tanaman di determinasi di balai materia medika Batu, kemudian dilakukan preparasi sampel meliputi pembuatan simplisia, ekstraksi.

3.7 Prosedur penelitian

3.7.1 Pembuatan ekstraksi. Adapun prosedur pembuatan ekstrak dengan metode maserasi (Depkes RI, 2008):

1. Masukkan satu bagian serbuk kering simplisia ke dalam maserator.
2. Tambahkan 10 bagian pelarut.
3. Rendam selama 16 jam sambil sekali-sekali diaduk.
4. Kemudian diamkan selama 18 jam.
5. Pisahkan maserat dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi.
6. Kumpulkan semua maserat

7. Diuapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental.

3.7.2 Ekstraksi Rimpang Kunyit

Di maserasi serbuk simplisia Rimpang kunyit 100 g / 1L etanol 70% kemudian didiamkan selama 2 hari, selanjutnya di saring dan di kentalkan menggunakan waterbath.

3.7.3 Ekstraksi Rimpang Kencur

Di maserasi serbuk simplisia Rimpang kencur 100g / 1L etanol 70% kemudian didiamkan selama 2 hari, selanjutnya di saring dan di kentalkan menggunakan waterbath.

3.7.4 Ekstraksi Kapulaga

Di maserasi serbuk simplisia kapulaga 100g / 1L etanol 70% kemudian didiamkan selama 2 hari, selanjutnya di saring dan di kentalkan menggunakan waterbath.

3.7.5 Ekstraksi Kulit kayu manis

Di maserasi serbuk simplisia kulit kayu manis 100g / 1L etanol 70% kemudian didiamkan selama 2 hari, selanjutnya di saring dan di kentalkan menggunakan waterbath.

3.7.6 Ekstraksi Asam jawa

Di maserasi serbuk simplisia asam jawa 100g / 1L etanol 70% kemudian didiamkan selama 2 hari, selanjutnya di saring dan di kentalkan menggunakan waterbath.

3.7.7 Prosedur pembuatan pereaksi Mayer, pereaksi Dragendrof, pereaksi wagner (Kristanti *et al.*, 2008)

3.7.7.1 Pembuatan Pereaksi Mayer :

1. Senyawa HgCl₂ sebanyak 1,5 gram dilarutkan dengan 60 ml aquades
2. Larutkan KI sebanyak 5 gram dalam 10 ml aquades
3. Kedua larutan yang dibuat tersebut kemudian dicampur dan di encerkan dengan aquades sampai volume 100 ml.
4. Pereaksi mayer yang diperoleh disimpan dalam botol gelap.

3.7.7.2 Pembuatan Pereaksi Dragendrof :

1. Bismut subnitrat sebanyak 1 gram di larutkan dalam campuran 10 ml asam asetat glasial dan 40 ml aquades
2. Larutkan 8 gram KI dalam 20 ml aquades.
3. Kedua larutan yangtelah dibuat di campur kemudian diencerkan dengan aquades sampai volumenya 100 ml
4. Pereaksi dragendrof harus disimpan dalam botol yang berwarna gelap dan hanya dapat digunakan selama periode beberapa minggu setelah di buat.

3.7.7.3 Pembuatan Pereaksi Wagner :

1. Senyawa KI sebanyak 2 gram dan iodine sebanyak 1,3 gram di larutkan dengan aquades sampai volume 100 ml, kemudian di saring.
2. Peraksi wagner ini harus disimpan dalam botol gelap.

3.7.8 Melakukan uji skrining fitokimia meliputi uji alkaloid, uji flavonoid, uji saponin, uji polifenol, uji tanin, uji terpenoid dan uji steroid(Kristanti et al., 2008).

3.7.8.1 Identifikasi Alkaloid (Simaremare, 2014):

1. Ekstrak dilarutkan dengan 5 mL HCl 2N.
2. Larutan yang didapat kemudian dibagi 3 tabung reaksi.

3. Tabung pertama digunakan sebagai blanko,
4. Tabung kedua ditambahkan pereaksi Dragendorff sebanyak 3 tetes,
5. Tabung ketiga ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid.

3.7.8.2 Identifikasi Flavonoid (Atmoko and Ma'aruf, 2009):

1. Ekstrak di tambahkan dengan air panas.
2. Di didihkan selama 5 menit.
3. Ditambahkan logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat.
4. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid.

3.7.8.3 Identifikasi Saponin (Indrayani *et al.*, 2006):

1. Ekstrak dalam tabung reaksi ditambah air (1 : 1).
2. Dikocok selama 5 menit.
3. Adanya busa yang dapat bertahan selama 30 menit menunjukkan adanya senyawa saponin.

3.7.8.4 Identifikasi Tanin (Indrayani *et al.*, 2006):

1. Ekstrak dilarutkan dalam 1-2 ml air
2. ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 0,1%
3. Timbulnya warna biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa tannin galat dan jika warnanya hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tannin katekol.

3.7.8.5 Identifikasi Sterol dan triterpen (Indrayani *et al.*, 2006):

1. Ekstrak diuapkan sampai kering,

2. kemudian residu yang dihasilkan dilarutkan dalam 0,5 ml kloroform,
3. lalu ditambah dengan 0,5 ml asam asetat anhidrat.
4. Selanjutnya campuran ini ditetesi dengan 1-2 ml H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung tersebut.
5. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpen, sedangkan munculnya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya sterol.

3.7.9 Uji kromatografi lapis tipis.

3.7.9.1 Prosedur Kerja Secara umum (Hanani, 2014):

1. Larutan bahan uji dan/atau pembanding yang sudah disiapkan ditotolkan pada lempeng (jarak antar totolan sekitar 1 – 1.5 cm) dengan volume tertentu, jarak 1,5 hingga 2 cm dari tepi bawah lempeng. Diameter totolan diusahakan sekecil mungkin dan dibiarkan mengering. Pada jarak rambat yang dikehendaki sebaiknya diberi tanda.
2. Lempeng dimasukkan kedalam bejana (yang sudah dijenuhkan dengan fase gerak), dengan posisi tegak dan bagian tepi bawah tercelup dalam fase gerak, tetapi totolan tidak sampai terendam.
3. Bejana ditutup rapat, dan fase gerak dibiarkan merambat hingga batas jarak rambat.
4. Lempeng dikeluarkan dan dikeringkan di udara, perhatikan bercak yang timbul dengan sinar tampak, ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya, diukur dan dicatat jarak rambat setiap bercak yang timbul dan fase gerak dari titik penotolan sehingga diperoleh nilai R_f dan atau R_x (R_x = jarak rambat bercak dibagi jarak rambat pembanding).

5. Lempeng disemprot dengan pereaksi yang sesuai, dan pengamatan diulangi seperti pada butir (4). Warna yang terjadi dicatat pada setiap pengamatan. Kadang-kadang pengamatan yang dilakukan sesudah penyemprotan memerlukan suhu lebih tinggi agar pembentukan warna lebih optimum. Setiap kali pengamatan sebaiknya dilakukan pada suhu yang sama.

3.7.9.2 Uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

1. Uji KLT (kromatografi lapis tipis) jamu iboe lancar haid untuk rimpang kunyit
Untuk melakukan uji KLT cairan eluensi yang digunakan yaitu kloroform : metanol (95:5) dan menggunakan silika gel 60 GF₂₅₄ sebagai fase diam, serta untuk deteksi warna menggunakan UV₃₆₆.
2. Uji KLT (kromatografi lapis tipis) jamu iboe lancar haid untuk asam jawa
Untuk melakukan uji KLT cairan eluensi yang digunakan yaitu toluen : etil asetat (3:9) dan menggunakan silika gel GF₂₅₄ sebagai fase diam, serta untuk deteksi warna menggunakan UV₂₅₄ dan UV₃₆₆.
3. Uji KLT (kromatografi lapis tipis) jamu iboe lancar haid untuk rimpang kencur
Untuk melakukan uji KLT cairan eluensi yang digunakan toluen : etil asetat (95:5) dan menggunakan silika gel 60 GF₂₅₄ sebagai fase diam, serta untuk deteksi warna menggunakan UV₂₅₄.
4. Uji KLT (kromatografi lapis tipis) jamu iboe lancar haid untuk kulit kayu manis
Untuk melakukan uji KLT cairan eluensi yang digunakan toluen : etil asetat (97:3) dan menggunakan silika gel GF₂₅₄ sebagai fase diam, serta untuk deteksi warna menggunakan UV₂₅₄.
5. Uji KLT (kromatografi lapis tipis) jamu iboe lancar haid untuk kapulaga
Untuk melakukan uji KLT cairan eluensi yang digunakan toluen P : aseton P (9:3)

dan menggunakan silika gel GF₂₅₄ sebagai fase diam, serta untuk deteksi warna menggunakan UV₂₅₄ dan Lampu Uv 366.

3.8 Analisis Data

Analisis data yang di dapat dari hasil identifikasi senyawa di dalam jamu lancar haid merk x dapat dilakukan pengolahan data yaitu diketahui hasil noda KLT yang terbentuk serta perhitungan harga R_f.