

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman beluntas (*Pluchea indica* L.) yang tumbuh di daerah Tawang Sari, Kota Sukoharjo, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan adalah daun beluntas segar dan kering.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah kadar (% rendemen), sifat fisikokimia dan komponen penyusun dalam minyak atsiri dari daun beluntas segar dan kering.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Klasifikasi diperlukan untuk menentukan pengambilan data dan metode analisis data berdasarkan hubungan sebab akibat menjadi variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung. Variabel terkontrol dalam penelitian ini merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti secara cepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah cara isolasi minyak atsiri daun beluntas, alat-alat yang digunakan, dan kondisi penelitian GC-MS. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah daun beluntas segar

dan kering. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar (% Rendemen), sifat fisikokimia dan komponen penyusun minyak daun beluntas secara GC-MS.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Definisi operasional variabel utama yang pertama, daun beluntas dalam keadaan segar dan sudah dikeringkan yang tumbuh di daerah Tawang Sari, Sukoharjo, Jawa Tengah. Definisi operasional variabel utama yang kedua, minyak atsiri yang dihasilkan dari isolasi dengan metode destilasi uap air daun beluntas dalam keadaan segar dan daun beluntas kering. Definisi operasional variabel utama yang ketiga, Kromatografi Gas dan Spektrometri Massa (GC-MS) adalah salah satu metode pemisahan komponen penyusun dalam suatu sampel minyak atsiri daun beluntas segar dan kering.

## **C. Teknik Sampling**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini diambil secara acak dari tanaman beluntas yang terdapat di daerah Tawang Sari, Sukoharjo, Jawa Tengah.

## **D. Bahan dan alat**

### **1. Bahan**

- a. Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan adalah daun beluntas yang terdapat di daerah Tawang Sari, Sukoharjo, Jawa Tengah.
- b. Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan antara lain : aquades, etanol 96%, pembanding eugenol, Natrium sulfatanhidrat, benzene, kloroform, Anisaldehyde asam sulfat.

## **2. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan digital, serangkaian alat destilasi uap air, vial, beaker glass, pipet tetes, gelas ukur, pipa kapiler, pipet volume, kertas saring, chamber, lempeng kromatografi, tisu, aluminium foil, gunting, oven dan instrumen GC-MS.

## **E. Alur Penelitian**

### **1. Determinasi Tanaman**

Tahap pertama penelitian adalah meyakinkan kebenaran sampel daun beluntas (*Pluchea indica* L.) yang berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis serta mencocokkan ciri morfologis yang ada pada tanaman. Determinasi dari suatu tanaman bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas tanaman tersebut, apakah tanaman tersebut benar-benar tanaman yang diinginkan. Dengan demikian kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan diteliti dapat dihindari.

### **2. Pengumpulan Bahan**

Daun beluntas yang digunakan dalam penelitian berasal dari daerah Tawanghari Kota Sukoharjo, Jawa Tengah yang diambil dalam keadaan segar secara acak pada pagi hari. Daun kemudian disortasi basah, dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang melekat. Selanjutnya dikering anginkan. Sedangkan untuk sampel daun beluntas kering dilanjutkan pengeringan dengan menggunakan oven suhu  $<50^{\circ}\text{C}$  selama 2-4 hari.

### **3. Isolasi minyak atsiri**

Isolasi minyak atsiri daun beluntas dilakukan dengan metode destilasi uap air dengan menggunakan pipa clavenger. Ditimbang daun beluntas 2500 gram. Bahan diletakkan di atas piring yang berupa ayakan yang terletak beberapa centimeter di atas permukaan air dalam ketel penyuling. Distilasi dilakukan sampai tidak ada tetesan minyak atsiri di pipa clavenger.

### **4. Pemeriksaan Organoleptis Minyak Atsiri**

Identifikasi organoleptik meliputi bentuk, rasa, warna dan bau. Pengamatan bentuk dilakukan dengan pengamatan secara langsung. Penentuan warna dilakukan dengan cara visual atau dengan kasat mata, uji organoleptik berdasarkan rasa dilakukan dengan mencampurkan satu tetes minyak atsiri dengan sepuluh tetes aquades, kemudian mencicipinya. Uji organoleptik berdasarkan bau dilakukan dengan meneteskan minyak atsiri sebanyak 2 tetes di atas kertas saring yang tidak berbau, kemudian mencium aromanya (Prayitno, 2006).

### **5. Uji Kelarutan dalam Etanol 96%**

Masing-masing sampel minyak atsiri diteteskan dengan volume yang sama dengan etanol 96% pada tabung reaksi yang bersih. Kemudian diamati dan dibandingkan larut atau tidak nya minyak atsiri. Tetesan alkohol dihentikan hingga minyak atsiri benar-benar larut dalam alkohol.

### **6. Indeks Bias**

Indeks bias minyak atsiri ditetapkan dengan menggunakan alat refraktometer dan dilihat suhunya pada saat pengukuran tersebut. Lensa refraktometer dibersihkan dengan kapas yang telah dibasahi dengan xylol,

kemudian dicoba mengukur indeks bias aquadest terlebih dahulu. Kemudian cairan sampel ditetapkan indeks biasnya dengan diteteskan 1-2 tetes pada prisma refraktometer dilihat perbedaan gelap dan terang kemudian baca besarnya indeks bias pada angka yang ditunjukkan oleh skala dengan menggunakan lensa okuler.

### **7. Identifikasi Minyak Atsiri Secara Kromatografi Lapis Tipis**

Analisis KLT minyak atsiri dilakukan dengan penotolan pada lempeng silika gel GF<sub>254</sub> dengan menggunakan pipa kapiler dengan pembanding eugenol. Lempeng tersebut dimasukkan ke dalam chamber yang telah dijenuhkan yang berisi fase gerak benzene : kloroform (9:1). Setelah fase gerak naik sampai tanda batas atas, lempeng dikeluarkan dari chamber dan dikeringanginkan. Deteksi noda dilakukan di bawah sinar UV<sub>254</sub> nm dan UV<sub>366</sub> nm, selanjutnya disemprot dengan pereaksi anisaldehyd-asamsulfat agar noda nya tampak jelas kemudian dipanaskan pada oven dengan suhu 105°C selama 5 menit. Warna yang timbul diamati, kemudian dihitung nilai Rf pada bercak dengan rumus sebagai berikut :

$$R_f = \frac{\text{jarak bercak}}{\text{jarak yang ditempuh oleh fase gerak}}$$

### **8. Identifikasi Komponen Penyusun Minyak Atsiri Secara Kromatografi Gas dan Spektrometri Massa (GC-MS).**

Kromatografi gas dan spektrometri massa (GC-MS) merupakan metode dengan menggunakan alat GC-MS memiliki fungsi untuk memisahkan komponen-komponen senyawa kimia yang akan dianalisis, alat ini bisa bekerja dengan sendirinya dengan mengarahkan melalui komputer. Hasil minyak atsiri dikumpulkan masing-masing 1 ml, minyak atsiri dimasukkan ke dalam vial khusus diencerkan dengan N-heksan, 20ul ke 500ul. Kemudian alat akan bekerja

sesuai dengan intruksinya, setelah 20-30 menit akan muncul peak hasil dari komponen minyak atsiri daun beluntas.

### 9. Analisis Rendemen Minyak Atsiri

Minyak atsri daun beluntas ditetapkan rendemennya dengan destilasi uap air menggunakan pipa clavenger. Daun beluntas segar dan kering masing-masing 2.500 gram, dilakukan penyulingan dengan menggunakan rangkaian alat destilasi yang telah terpasang. Distilasi dilakukan sampai tidak ada tetesan minyak atsiri di pipa Clavenger. Rendemen minyak atsiri dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen minyak atsiri } (\% \frac{v}{b}) = \frac{\text{volume minyak atsiri}}{\text{berat sampel}} \times 100$$

### F. Skema Penelitian

