

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengidentifikasi pengaruh proses perebusan kacang komak hitam dan putih dari Desa Sebalong, Sanganom, dan Klampok terhadap fitosterol (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan  $\beta$ -sitosterol) serta mengidentifikasi perbedaan fitosterol pada kedua kacang komak yang berasal dari ketiga desa tersebut. Penelitian ini dirancang dengan tahapan sebagai berikut:

1. Preparasi Kacang Komak (*Lablab purpureus* L. Sweet)

- a. Pembuatan serbuk kacang komak mentah;
- b. Perebusan kacang komak dan pembuatan serbuk kacang komak direbus;
- c. Penetapan *moisture content* kacang komak mentah dan direbus;
- d. Kacang komak direbus yang kadar airnya telah ditetapkan, dikeringkan menggunakan oven.

2. Ekstraksi Kacang Komak (*Lablab purpureus* L. Sweet)

Ekstraksi kacang komak mentah dan direbus dengan *n*-heksana, aseton, dan kloroform (Indrayanto *et al.*, 1994).

3. Uji Pendahuluan Kandungan Fitosterol dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

- a. Penotolan ekstrak *n*-heksana pada plat KLT dengan fase diam = silika gel 60 F<sub>254</sub> dan fase gerak = *n*-heksana : etil asetat = 4 : 1;

- b. Penyemprotan plat KLT dengan penampak noda anisaldehyd- $H_2SO_4$  (Indrayanto *et al.*, 1994).
4. Analisis Kandungan Fitosterol Kacang Komak (*Lablab purpureus* L. Sweet) dengan Kromatografi Gas FID (KG-FID)  
Identifikasi ekstrak *n*-heksana, aseton, dan kloroform kacang komak mentah dan direbus dengan KG-FID.
5. Analisis Kacang Komak (*Lablab purpureus* L. Sweet) dengan *Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared* (ATR-FTIR)
  - a. Penempatan serbuk kacang komak mentah pada *plate platinum*;
  - b. Pembacaan absorbansi dengan memposisikan kontak antara ujung kristal dengan sampel.
6. Analisis Data  
Analisis data dengan uji *two-way* ANOVA menggunakan *Software Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) *Statistics* 17,0.

#### **4.2 Pengambilan Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang komak hitam dan putih (*Lablab purpureus* L. Sweet), berasal dari tiga desa di Jawa Timur, yaitu Desa Sebalong dan Sanganom diperoleh dari petani yang berlokasi di Kecamatan Nguling, Kabupaten Pasuruan, serta dari Desa Klampok yang berlokasi di Kecamatan Tongas, Kabupaten Probolinggo pada tanggal 1 Oktober 2018. Sampel telah dideterminasi oleh Dr. Sugeng Budiharta, M.Sc. pada tanggal 5 Desember 2018 di Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi LIPI Kecamatan Purwodadi, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur.

### **4.3 Variabel Penelitian**

#### **4.3.1 Variabel Bebas**

1. Proses perebusan dilakukan di dalam *beaker glass* di atas kompor dengan menggunakan *aquadest* mendidih suhu 100°C selama 30 menit.
2. Kacang komak hitam dan putih yang berasal dari Desa Sebalong, Sanganom, dan Klampok.

#### **4.3.2 Variabel Kontrol**

Berat kacang komak hitam dan putih dari tiap desa yang akan diekstraksi setelah diketahui *moisture content*-nya.

#### **4.3.3 Variabel Tergantung**

Pengaruh proses perebusan kacang komak hitam dan putih dari Desa Sebalong, Sanganom, dan Klampok terhadap fitosterol (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan  $\beta$ -sitosterol) serta perbedaan fitosterol pada kedua kacang komak yang berasal dari ketiga desa.

#### **4.3.4 Definisi Operasional Variabel**

1. Kacang komak yang berwarna hitam dan putih, berbentuk bulat telur berukuran 1- 2 cm.
2. Perebusan kacang di dalam air yang telah mendidih pada suhu 100°C selama 30 menit.

### **4.4 Bahan Penelitian**

Bahan penelitian yang digunakan adalah kacang komak hitam dan putih (*Lablab purpureus* L. Sweet), standar (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan  $\beta$ -sitosterol) (*Sigma*), *n*-heksana p.a, aseton p.a, kloroform p.a, asam klorida p.a,

natrium hidroksida p.a, etil asetat p.a, penampak noda anisaldehyd- $H_2SO_4$  (*Merck*), dan aquadest (*Mili-Q*).

#### **4.5 Instrumen Penelitian**

Instrumen penelitian yang digunakan adalah *Chromatographic plate* 20 cm × 10 cm *Silica Gel* 60 F<sub>254</sub> *TLC plate*, *Merck (Darmstadt, Germany)*, *Camag chamber* 20 cm × 10 cm, kapiler 2 µL, *ALPHA II FTIR Spectrometer*, *Hewlett Packard Gas Chromatograph 5890 Series II* dengan *Flame Ionization Detector (FID)* dan Kolom *HP-5 (cross-linked 5% phenyl methyl silicone, 25 m × 0.32 mm × 0.17 µm film thickness)*, alat suntik (*Hamilton Micro Syringe 10 µL*), *moisture content (Mettler Toledo)*, *ultrasonic (Branson 1510)*, *centrifuge (EBA-20)*, *vortex (IKA)*, *waterbath*, timbangan analitik (*Ohaus*), oven, dan alat-alat gelas laboratorium.

#### **4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga pada bulan Oktober 2018 sampai Desember 2019.

#### **4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data**

##### **4.7.1 Preparasi Kacang Komak (*Lablab purpureus L. Sweet*)**

Sampel berupa kacang komak hitam dan putih dari Desa Sebalong, Sanganom, dan Klampok mentah dihaluskan dengan menggunakan blender kemudian diayak. Sebagian kacang komak hitam dan putih yang lain diolah dengan proses perebusan terlebih dahulu. Cara pengolahannya dilakukan dengan

memasukkan kacang ke dalam *beaker glass* berisi *aquadest* mendidih pada suhu 100°C selama 30 menit. Kacang komak hitam dan putih tiap desa yang telah direbus kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender.

Masing-masing kacang komak hitam dan putih tiap desa mentah dan direbus yang telah halus dilakukan penetapan *moisture content* dengan menempatkan tiap kacang sejumlah kurang lebih 1 gram ke dalam alat *Mettler Toledo* pada suhu 105°C selama 10 menit. Selanjutnya, dilakukan penimbangan berat kering tiap kacang sejumlah kurang lebih 1 gram (Indrayanto *et al.*, 1994) kemudian dilakukan pengeringan pada kacang komak direbus menggunakan oven ( $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , semalam).

#### **4.7.2 Ekstraksi Kacang Komak (*Lablab purpureus* L. Sweet)**

Tiap kacang yang telah ditimbang akan mendapatkan perlakuan yang sama melalui tahapan berikut ini, yaitu diekstraksi menggunakan 5 mL *n*-heksana, di-ultrasonik selama 15 menit, di-*vortex* selama 10 menit, di-sentrifugasi selama 10 menit dengan putaran 2.500 rotasi per menit (rpm) dan tahapan ini diulangi sebanyak lima kali. Semua filtrat berupa ekstrak fraksi *n*-heksana dan residu dikumpulkan serta diuapkan hingga kering (Indrayanto *et al.*, 1994).

Residu diekstraksi menggunakan 5 mL aseton, di-ultrasonik selama 15 menit, di-*vortex* selama 10 menit, di-sentrifugasi selama 10 menit dengan putaran 2.500 rpm dan tahapan ini diulangi sebanyak tiga kali. Semua filtrat berupa ekstrak fraksi aseton dan residu dikumpulkan serta diuapkan hingga kering. Selanjutnya, residu dihidrolisis menggunakan 7,5 mL HCl 2 N di atas *waterbath* pada suhu 90-100°C selama 30 menit dan didinginkan kemudian

dinetralkan dengan NaOH 12 N hingga pH 7 dan dibasakan hingga pH 10 kemudian disaring (Indrayanto *et al.*, 1994).

Filtrat diekstraksi menggunakan 5 mL kloroform, di-ultrasonik selama 15 menit, di-*vortex* selama 10 menit, di-sentrifugasi selama 10 menit dengan putaran 2.500 rpm dan tahapan ini diulangi tiga kali. Semua filtrat berupa ekstrak fraksi kloroform atau hidrolisat dikumpulkan serta diuapkan hingga kering dan apabila akan digunakan untuk analisis, maka ekstrak kering tersebut dapat dilarutkan kembali dengan kloroform (Indrayanto *et al.*, 1994).

Ekstrak fraksi *n*-heksana digunakan untuk menganalisis sterol bebas, ekstrak fraksi aseton digunakan untuk memastikan semua sterol telah terekstraksi sempurna pada proses ekstraksi sebelumnya, sedangkan ekstrak fraksi kloroform atau hidrolisat digunakan untuk menganalisis sterol terikat (Indrayanto *et al.*, 1994).

#### **4.7.3 Uji Pendahuluan Kandungan Fitosterol dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui kacang komak hitam dan putih dari tiap desa mengandung fitosterol dengan menotolkan standar stigmasterol dan ekstrak *n*-heksana tiap kacang dari masing-masing desa sebanyak 2-4  $\mu\text{L}$  pada plat silika gel 60 F<sub>254</sub> dan dieluasi dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat = 4 : 1 (v/v) kemudian disemprot dengan pereaksi penampak noda anisaldehyd-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Indrayanto *et al.*, 1994). Apabila bercak noda yang ditimbulkan berwarna keunguan, maka kacang tersebut mengandung terpenoid atau steroid (Sherma and Fried, 2003). Dalam hal ini stigmasterol digunakan sebagai standar pembanding.

#### 4.7.4 Analisis Kandungan Fitosterol Kacang Komak (*Lablab purpureus* L. Sweet) dengan Kromatografi Gas FID (KG-FID)

Kandungan fitosterol diidentifikasi dengan menggunakan alat *Hewlett Packard Gas Chromatograph 5890 Series II* dan detektor ionisasi nyala (*flame ionization detector/FID*) suhu 290°C dan kolom HP-5 (*cross-linked 5% phenyl methyl silicone, 25 m × 0.32 mm × 0.17 μm film thickness*), gas pembawa helium dengan kecepatan alir 1,7 kg/cm<sup>2</sup>, alat suntik *Hamilton Micro Syringe* 10 μL dengan volume penyuntikan 2 μL, *split ratio* 1 : 25, dan *running time* selama 30 menit.

##### 1. Analisis kualitatif

Analisis kandungan fitosterol dilakukan dengan menambahkan kloroform pada semua ekstrak (*n*-heksana, aseton, dan kloroform) kemudian diinjeksikan ke dalam KG-FID. Fitosterol diidentifikasi dengan mengamati waktu retensi relatif sampel yang dibandingkan dengan waktu retensi relatif standar (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β-sitosterol). Jika waktu retensi relatif yang dimiliki sama, maka sampel dapat dikatakan mengandung senyawa yang identik dengan standar. Selanjutnya, dilakukan konfirmasi dengan metode adisi atau *spiking* dengan cara menambahkan standar, memiliki sifat fisika kimia yang sama dengan analit, ke dalam sampel yang akan diuji (McNair and Miller, 2009).

##### 2. Analisis kuantitatif

Linearitas, batas deteksi (*limit of detection/LOD*), dan batas kuantifikasi (*limit of quantification/LOQ*) dilakukan dengan mengencerkan larutan baku standar stigmasterol (*Sigma Aldrich*) 1.012,4 bpj menjadi lima konsentrasi baku kerja antara 300 – 1.000 bpj.

Persentase fitosterol kacang komak hitam dan putih dari tiap desa dihitung dengan perbandingan area tiap sterol terhadap jumlah area seluruh sterol, sehingga diperoleh persentase relatif tiap sterol (Kaloustian *et al.*, 2008).

$$RL = \frac{A_i \times 100}{A_t}$$

RL = Kadar relatif tiap sterol (%);

A<sub>i</sub> = Area tiap sterol;

A<sub>t</sub> = Jumlah area seluruh sterol.

#### **4.7.5 Analisis Kacang Komak (*Lablab purpureus* L. Sweet) dengan *Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared* (ATR-FTIR)**

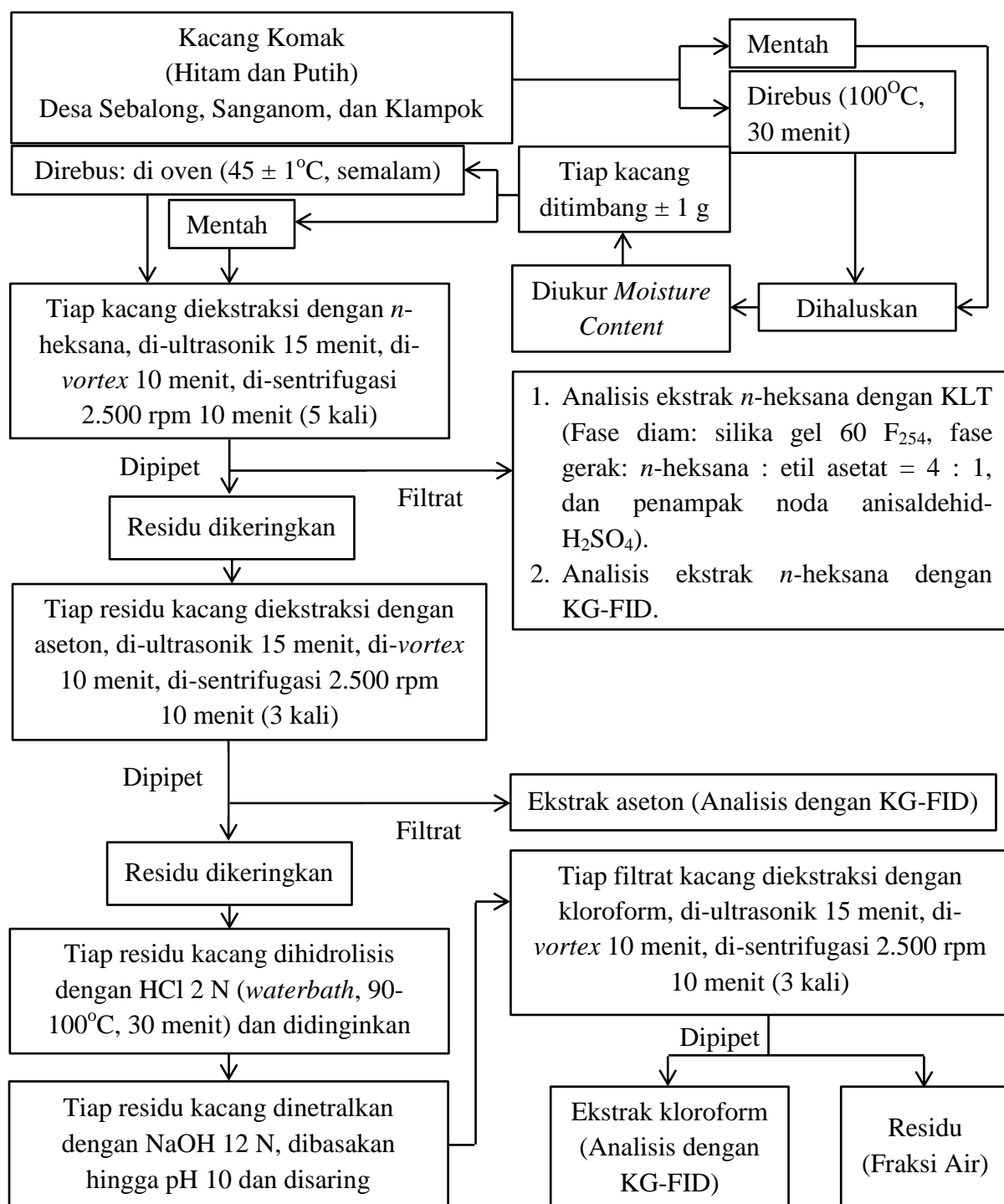
Serbuk kacang komak hitam dan putih dari tiap desa ditempatkan pada *plate platinum* yang dilengkapi dengan material kristal ZnSe. Ujung kristal diposisikan menyentuh sampel dengan sedikit ditekan untuk memastikan kontak penuh terhadap sampel. Sebelum dan setelah menggunakan alat, kristal dibersihkan dengan etanol 70% untuk menghindari kontaminasi dan gangguan pada spektrum.

#### **4.8 Analisis Data**

Analisis data dilakukan dengan menggunakan *Software* SPSS 17,0 dengan membandingkan kandungan fitosterol kacang komak hitam dan putih terhadap proses pengolahan (mentah dan direbus) serta membandingkan kandungan fitosterol kedua kacang komak dari Desa Sebalong, Sanganom, dan Klampok menggunakan uji *two-way* ANOVA. Nilai signifikansi < 0,05 (*p-value* < 0,05) menunjukkan bahwa antar variabel memiliki perbedaan yang signifikan.



### 4.9 Kerangka Operasional Penelitian



Sumber: Indrayanto *et al.*, 1994

Gambar 4.1 Skema kerangka operasional penelitian