

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian kuantitatif dan dirancang menggunakan metode pra eksperimental, dimana setiap pengujiannya dilakukan secara *triplo* atau tiga kali pengulangan.

#### 3.2. Sampel

Pada penelitian ini, sampel yang digunakan yaitu rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) dimana sampel ini didapatkan di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO).

#### 3.3. Alat dan Bahan

##### 3.3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik digital, Spektrofotometer *Uv-Visible* (*Thermo Scientific Evolution Pro*), labu ukur (*Pyrex*), kaca arloji, spatel logam, pipet tetes, cawan penguap, vial, *beaker glass* (*Pyrex*), penjempit kayu, tabung reaksi (*Pyrex*), corong, rak tabung reaksi, batang pengaduk (*Pyrex*), blender, *water bath*, gelas ukur (*Pyrex*), toples, cawan penguap, kertas saring, *Ultrasonic Cleaner*, *rotary evaporator*, dan erlenmeyer (*Pyrex*).

##### 3.3.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) hasil maserasi dan ultrasonik, etanol 96%, Larutan DPPH, aquadest, etanol p.a, asam askorbat (Vitamin C), kloroform, asam klorida (HCl), kalium hidroksida (KOH), gelatin, vanillin, dragendroff, mayer, dan magnesium..

### 3.4. Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.4.1 Tempat Penelitian

Tempat dilakukannya penelitian ini adalah di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Instrumental Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

#### 3.4.2 Waktu Penelitian

Waktu dimulainya Penelitian adalah Mei 2024 – Agustus 2024.

### 3.5. Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu ekstrak etanol 96% rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) ekstraksi maserasi dan ultrasonik.

#### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan pada penelitian ini adalah pengujian organoleptik, skrinning fitokimia, dan uji antioksidan vitamin C, ekstrak etanol temulawak ekstraksi maserasi dan ultrasonik.

#### 3.5.3 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel pada penelitian ini disusun menggunakan tabel, dimana dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

**Tabel 3. 1** Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
<b>Variable Bebas</b>					
1	Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak Ekstraksi Maserasi	Ekstrak etanol rimpang temulawak ekstraksi maserasi ialah ekstrak kental yang didapat pada simplisia temulawak dimana pada prosesnya adalah diekstraksi dengan etanol 96% untuk memperoleh rendemen ekstrak.	Observasi	Nominal	%

2	Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak Ekstraksi Ultrasonik	Ekstrak etanol rimpang temulawak ekstraksi ultrasonik ialah ekstrak kental yang didapat pada simplisia temulawak dimana pada prosesnya adalah diekstraksi dengan etanol 96% untuk memperoleh rendemen ekstrak.	Observasi	Nominal	%
---	---	--	-----------	---------	---

#### Variabel Terikat

3	Organoleptik	Parameter fisik menggunakan panca indera dalam pengujian	Panca Indera	Nominal	1. Warna 2. Aroma 3. Tekstur
4	Skrinning Fitokimia Alkoloid	Skrinning fitokimia merupakan pengujian yang menyatakan adanya metabolit sekunder dengan menggunakan pereaksi, adanya perubahan warna menyatakan bahwa pada tanaman tersebut senyawa alkoloid	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
5	Skrinning Fitokimia Flavonoid	Skrinning fitokimia merupakan pengujian yang menyatakan adanya metabolit sekunder dengan menggunakan pereaksi, adanya perubahan warna menyatakan bahwa pada tanaman tersebut senyawa flavonoid	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
6	Skrinning Fitokimia Saponin	Skrinning fitokimia merupakan pengujian yang menyatakan adanya metabolit sekunder dengan menggunakan pereaksi, terbentuknya busa menyatakan bahwa pada tanaman tersebut senyawa saponin	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif

7	Skrinning Fitokimia Tanin	Skrinning merupakan yang menyatakan adanya metabolit sekunder dengan menggunakan pereaksi, adanya perubahan warna menyatakan bahwa pada tanaman tersebut terdapat senyawa tanin	fitokimia pengujian menyatakan metabolit dengan pereaksi, adanya perubahan warna menyatakan bahwa pada tanaman tersebut terdapat senyawa tanin	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
8	Skrinning Fitokimia Steroid	Skrinning merupakan yang menyatakan adanya metabolit sekunder dengan menggunakan pereaksi, adanya perubahan warna menyatakan bahwa pada tanaman tersebut terdapat senyawa steroid	fitokimia pengujian menyatakan metabolit dengan pereaksi, adanya perubahan warna menyatakan bahwa pada tanaman tersebut terdapat senyawa steroid	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
9	Pengujian antioksidan metode DPPH ekstrak kental temulawak dengan ekstraksi maserasi	Pengujian dari ekstrak rimpang temulawak ( <i>Curcuma xanthorrhiza</i> ) dilakukan dengan metode DPPH mengukur absorbansinya	antioksidan etanol menggunakan DPPH dengan nilai	Spektrofotometri UV-Vis	Rasio	Ppm (per part million)
10	Pengujian antioksidan metode DPPH ekstrak kental temulawak dengan ekstraksi ultrasonik	Pengujian dari ekstrak rimpang temulawak ( <i>Curcuma xanthorrhiza</i> ) dilakukan dengan metode DPPH mengukur absorbansinya	antioksidan etanol menggunakan DPPH dengan nilai	Spektrofotometri UV-Vis	Rasio	Ppm (per part million)

### 3.6. Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Determinasi Tumbuhan

Penelitian ini dimulai dengan melakukan proses identifikasi dan determinasi tumbuhan temulawak dengan cara membandingkan ciri-ciri morfologis yang terdapat dalam *literature*. Tujuan dari dilakukannya proses

determinasi ini ialah untuk menghindari kesalahan penggunaan sampel atau bahan yang akan digunakan selama proses penelitian berlangsung (Silfiana dan Umarudin, 2019). Determinasi tanaman utuh temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dilakukan di Universitas Padjadjaran (UNPAD) tepatnya di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi FMIPA.

### 3.6.2 Paramater Standarisasi Simplisia

#### 3.6.2.1. Parameter Non Spesifik

##### a. Kadar Air

Penentuan uji kadar air dilakukan menggunakan metode gravimetri, dimana 2 gram simplisia dimasukan kedalam krus porselin yang sebelumnya dilakukan proses pemanasan pada suhu 105°C selama 30 menit lalu didesikator selama 30 menit dan telah ditara. Kurs yang sudah diisi oleh 2 gram simplisia selanjutnya dilakukan pengovenan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang, lalu didinginkan kedalam desikator selama 15 menit dan di timbang (Fikayuniar, Abriyani dan Aminah, 2021).

Berdasarkan Standar Nasional Indonesia 2013, rumus kadar air adalah sebagai berikut :

$$\text{Kadar air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan :

$W_0$  = Bobot kurs kosong

$W_1$  = Bobot kurs + sampel sebelum dioven

$W_2$  = Bobot kurs + sampel setelah dikeringkan

##### b. Kadar Abu Total

Sebanyak 2 gram simplisia dimasukan kedalam kurs silikat yang sebelumnya telah dipijarkan, kemudian ditara, dan diratakan. Ditimbang berat kurs kosong. Dilakukan proses pemijaran suhu 500-600°C dengan alat tanur selama 3 jam, lalu didinginkan menggunakan desikator kemudian ditimbang (Fikayuniar, Abriyani dan Aminah, 2021).

Berdasarkan Standar Nasional Indonesia 2013, kadar abu total dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar abu total} = \frac{W_1 - W_0}{W_2 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan :

$W_0$  = Bobot kurs kosong

$W_1$  = Bobot kurs + sampel sebelum diabukan

$W_2$  = Bobot kurs + sampel setelah diabukan

### c. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Pada pengujian kadar abu total akan didapatkan abu total, yang kemudian abu tersebut dilakukan pengujian kadar abu tidak larut asam, dimana pada pengujiannya hasil abu total di didihkan menggunakan 25 mL HCl encer dalam kurun waktu 5 menit. Bagian yang tidak larut dalam asam dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring bebas abu. Kadar abu tidak larut asam ini dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Utami *et al.*, 2017) :

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu tidak larut asam}}{\text{berat simplisia awal}} \times 100\%$$

### 3.6.2.2. Parameter Spesifik

#### a. Kadar Sari Larut Air

Simplisia sebanyak 5 gram dimaserasi menggunakan air-kloroform selama 24 jam di dalam labu Erlenmeyer sebanyak 100 mL. air-kloroform dibuat dengan cara mencampurkan 2,5 mL kloroform dalam 1000 mL aquadest. Pada prosesnya dikocok setiap jam sekali selama 6 jam pertama, setelahnya didiamkan selama 18 jam. Setelah proses maserasi selesai langkah selanjutnya adalah proses penyaringan. Hasil dari filtrate yang didapatkan dari proses penyaringan diambil sebanyak 20 mL kemudian diuapkan diatas penangas air hingga kering didalam cawan penguap yang telah ditera. Residu hasil penguapan kemudian di oven pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Presentase senyawa yang larut dalam air dapat

dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Fikayuniar, Abriyani dan Aminah, 2021):

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times \frac{\text{pelarut yang digunakan}}{\text{filtrate yang digunakan}} \times 100\%$$

#### b. Kadar Sari Larut Etanol

Simplisia sebanyak 5 gram dimaserasi menggunakan etanol 96% selama 24 jam di dalam labu Erlenmeyer sebanyak 100 mL. Pada prosesnya dikocok setiap jam sekali selama 6 jam pertama, setelahnya didiamkan selama 18 jam. Setelah proses maserasi selesai langkah selanjutnya adalah proses penyaringan. Hasil dari filtrate yang didapatkan dari proses penyaringan diambil sebanyak 20 mL kemudian diuapkan diatas penangas air hingga kering didalam cawan penguap yang telah ditera. Residu hasil penguapan kemudian di oven pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Presentase senyawa yang larut dalam etanol dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Fikayuniar, Abriyani dan Aminah, 2021):

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times \frac{\text{pelarut yang digunakan}}{\text{filtrate yang digunakan}} \times 100\%$$

### 3.6.3 Proses Ekstraksi Maserasi Ekstrak Etanol Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb)

Simplisia rimpang temulawak dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstraksi dimulai dengan menimbang 500 gram simplisia temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) yang kemudian dilarutkan menggunakan etanol 96% dengan jumlah pelarut 5000 mL. Simplisia yang sudah terendam oleh pelarut didiamkan selama 3 hari atau 3 x 24 jam dan sesekali diaduk setiap sekitar 6 jam sekali. Langkah selanjutnya yaitu proses penyaringan. Filtrate yang telah didapatkan setelah didiamkan selama 3 hari, kemudian disaring dan hasil penyaringan dilakukan penguapan dengan alat *vacum rotary evaporator* yang dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Rempah san Obat (BALITTRO) hingga mendapat ekstrak kental.

### 3.6.4 Proses Ekstraksi Ultrasonik Ekstrak Etanol Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb)

Dengan mengacu pada (Fauziah dan Wakidah, 2019), proses ekstraksi ultrasonik dimulai dengan cara menimbang 20 gram simplisia temulawak menggunakan timbangan analitik dan ditambahkan dengan perbandingan pelarut 1:10 tepatnya etanol 96% sebanyak 200 mL. Selanjutnya, proses ekstraksi dilakukan dengan suhu 45°C selama 60 menit menggunakan alat *ultrasonic bath*. Ekstraksi diulang sebanyak 3 kali pengulangan. Hasil ekstraksi atau filtratnya disaring menggunakan *rotary* yang dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO) hingga mendapatkan ekstrak kental.

### 3.6.5 Skrining Fitokimia

#### 1. Alkaloid

Ekstrak etanol dimasukan masing masing 0,5 gram pada tabung 1 dan tabung 2. Kemudian tabung A dan tabung B masing-masing dimasukan 0,5 mL asam klorida 2% hingga tercampur merata. Setelah itu pada tabung 1 ditambahkan reagen *Dragendroff* sebanyak 2 hingga 3 tetes reagen, dan pada tabung 2 ditambahkan 2 hingga 3 tetes reagen *Mayer*. Terdapatnya endapan berwarna putih atau kekuningan pada tabung 1 dan terbentuknya warna merah atau merah bata, jingga pada tabung 2 menandakan adanya aktivitas senyawa alkaloid (Goa *et al.*, 2021).

#### 2. Flavonoid

Ekstrak etanol kental temulawak dilarut menggunakan air panas sedikit hingga larut kemudian pita Magnesium di tambahkan secukupnya bersamaan dengan 1 mL asam klorida pekat. Flavonoid menunjukan dengan adanya perubahan warna jingga hingga merah (Goa *et al.*, 2021).

#### 3. Saponin

Ekstrak kental dilarutkan dalam aquades yang sudah dididihkan, kemudian digoyangkan dengan kuat selama 10 detik. Apabila setelah proses pengocokan terbentuk buih-buih maka ditambahkan dengan HCl 1N, jika



busa tidak hilang dalam kurun waktu 10 menit dengan ketinggian busa 1 hingga 3 cm maka senyawa positif mengandung saponin (Goa *et al.*, 2021).

#### 4. Tanin

Sejumlah ekstrak yang telah dilarutkan dengan sedikit air panas, dimasukkan kedalam tabung reaksi yang kemudian diberi  $\text{FeCl}_3$  1%. Jika terdapat warna hijau kehitaman atau biru tua maka dinyatakan positif tanin (Goa *et al.*, 2021).

#### 5. Triterpenoid dan Steroid

Uji ini dilakukan dengan cara mencampurkan ekstrak kental dengan kloroform sebanyak 0,5mL dan asam asetat anhidrat sebanyak 0,5mL. Lalu diberikan 1 hingga 2 mL asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) pekat pada tepian tabung reaksi. Adanya perubahan warna menjadi biru kehijauan maka terdapat komponen steroid, jika warna berubah menjadi ungu maka adanya komponen triterpenoid (Goa *et al.*, 2021).

#### 3.6.6 Pengujian Antioksidan Ekstrak Etanol Temulawak

Pengujian antioksidan pada ekstrak etanol temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dilakukan menggunakan metode DPPH (2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil). Uji aktivitas antioksidan ini mengacu pada jurnal yang dilakukan oleh (Kuntorini, 2018). Dimana pada pengujiannya meliputi :

##### 1. Pembuatan Larutan DPPH

Pada konsentrasi 50 ppm larutan DPPH dibuat dengan cara 2,5 mg serbuk DPPH ditambahkan etanol p.a 50 mL hingga mencapai tanda batas. Setelah tercampur dengan sempurna kemudian dilapisi dengan aluminium foil.

##### 2. Penentuan Panjang Gelombang

Sebanyak 4 mL larutan DPPH dipipet dan dimasukkan ke dalam kuvet. Langkah selanjutnya yaitu melakukan pengukuran panjang gelombang maksimum menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm.

### **3. Pembuatan Larutan Blanko**

Larutan blanko di buat dengan cara larutan DPPH 50 ppm sebanyak 2 mL dimasukan kedalam botol coklat dan ditambahkan dengan etanol p.a sebanyak 2 mL. Kemudian larutan tersebut diinkubasi dalam kurun waktu 30 menit pada ruang tertutup atau terhindar dari sinar cahaya.

### **4. Pembuatan Larutan Vitamin C**

Pembuatan larutan vitamin C atau larutan pembanding dimulai dengan cara 2,5 mg sampel vitamin C ditimbang lalu diukur menggunakan alat labu ukur 50 mL. Langkah selanjutnya adalah vitamin C dihomogenkan dengan etanol p.a hingga mencapai tanda batas. Variasi konsentrasi dibuat dengan variasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, Dan 10 ppm. Variasi konsentrasi dibuat menggunakan labu ukur 10 mL.

### **5. Pembuatan Larutan Ekstrak Temulawak**

Dibuat larutan induk ekstrak dengan konsentrasi 1000 ppm. Dimulai dengan 25 mg ekstrak etanol dilakukan penimbangan, yang kemudian dihomogenkan menggunakan etanol p.a pada labu ukur 25 mL hingga tanda batas. Selanjutnya hasil dari larutan induk dibuat variasi konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, dan 125 ppm. Setiap variasi konsentrasi ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas menggunakan labu ukur 10 mL.

### **6. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Temulawak**

Pengujian dimulai dengan memimet masing-masing larutan induk ekstrak temulawak sebanyak 2 mL, dilanjutkan dengan menambahkan 2 mL larutan DPPH. Kemudian dilakukan proses inkubasi selama 30 menit dan dilihat serta dianalisis absorbansinya menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

### **7. Penentuan Nilai IC<sub>50</sub>**

Suatu sampel yang dilakukan analisis aktivitas antioksidannya ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH. Cara melakukannya

adalah menggunakan rumus perhitungan presentase penghambatan atau inhibisi serapas DPPH yakni :

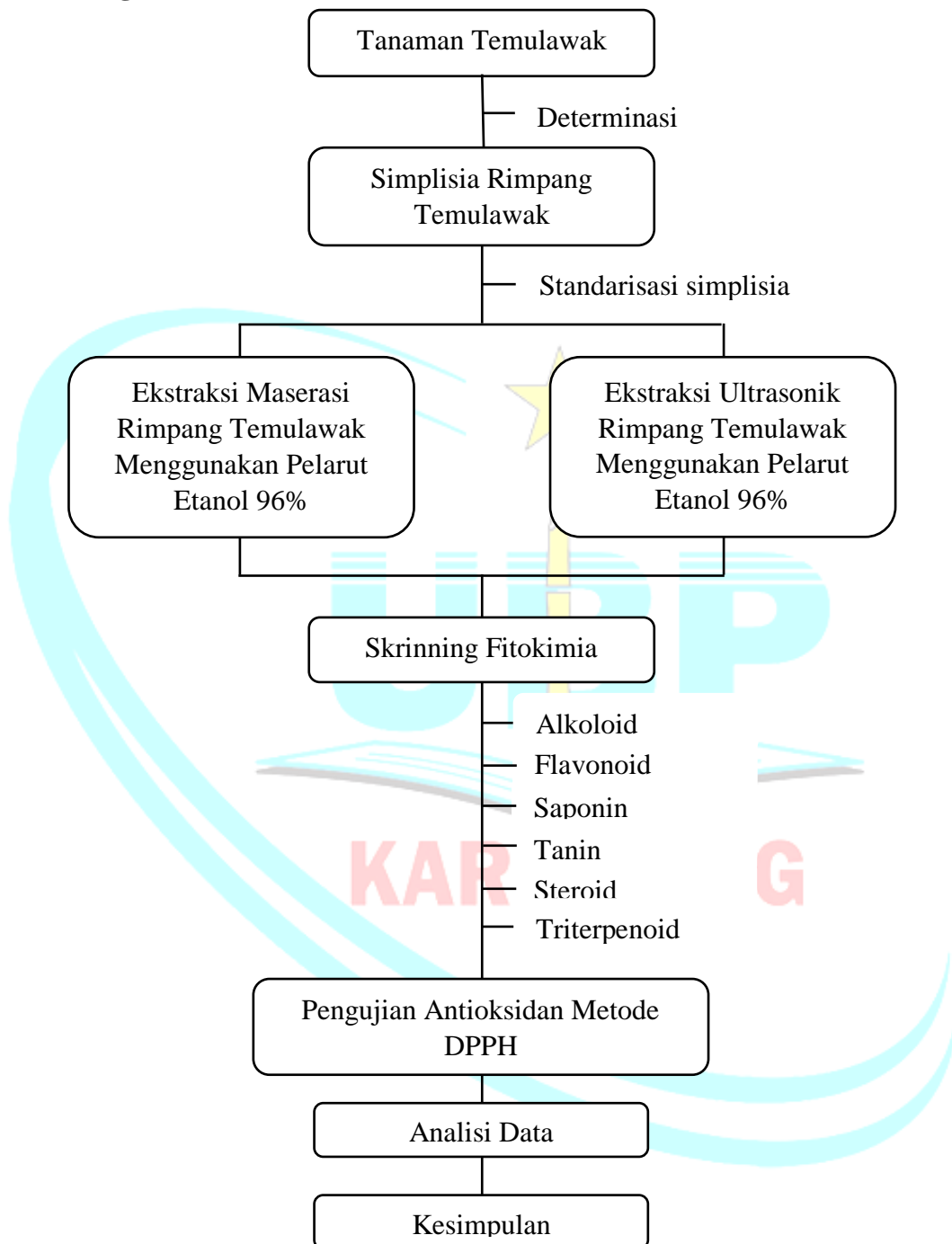
$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

IC<sub>50</sub> inilah yang digunakan sebagai penentuan aktivitas antioksidan . Nilai IC<sub>50</sub> adalah hasil yang dapat menyatakan seberapa besar konsentrasi senyawa uji yang dapat menangkap radikal bebas. Semakin kuat nilai IC<sub>50</sub> maka semakin kecil aktivitas antioksidannya, maka jika semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> maka semakin suatu senyawa mempunyai aktivitas antioksidan sebagai penangkap radikal bebas yang lebih baik (Erviana *et al.*, 2016).

### 3.7. Analisis Data

Analisis data pengujian antioksidan pada penelitian ini adalah dengan cara mencari nilai IC<sub>50</sub>. Hasil analisis data pada pengujian ini dibuat pada Microsoft Excel untuk mendapatkan persamaan regresi linear, dimana persamaan ini untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub> pada sampel. Data yang dihasilkan merupakan nilai absorbansi yang didapatkan dari pengukuran menggunakan spektro UV-Vis yang kemudian dianalisis menggunakan aplikasi *one-way* ANOVA.

### 3.8. Diagram Alir



**Gambar 3. 1** Alur Penelitian

