

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini bersifat ekperimental yang dilaksanakan di laboratorium Universitas Ngudi Waluyo yang ditujukan untuk menganalisis kandungan dari flavonoid dalam ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var Rubrum*) dengan menggunakan pembanding kuersetin dan pembanding rutin, sampel jahe diperoleh dari pemasok jahe merah yang berasal dari Temanggung dan diambil di Genuk Semarang. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan tiga buah perlakuan yakni dengan metode maserasi, soxhletasi, dan metode refluks. Penelitian yang dilaksanakan ini bermaksud untuk menganalisis metode yang paling efektif dalam proses penarikan ekstrak flavonoid yang terkandung dalam sampel jahe merah (*Zingiber officinale var Rubrum*) / membandingkan kadar flavonoid pada ekstrak jahe merah dengan metode ekstraksi maserasi, refluks dan soxhletasi serta dengan pembanding rutin dan kuersetin yang sudah dilaksanakan.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a. Determinasi jahe merah dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Fakultas Sain dan Matematika Departmen Biologi Universitas Diponegoro

- b. Pengeringan rimpang jahe hingga menjadi simplisia dilaksanakan di Laboratorium Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
- c. Pembuatan ekstrak simplisia jahe merah dengan beberapa metode ekstraksi dilakukan di Laboratorium Fitofarmaka Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
- d. Pengujian kandungan zat Flavonoid Ekstrak Rimpang Jahe Merah dilakukan di Laboratorium Instrumen Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

2. Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dimulai pada bulan Oktober 2021 – Februari 2022

C. Variabel penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian yaitu menggunakan beberapa metode ekstraksi yang terdiri dari 3 metode yaitu Maserasi, Refluks, dan Soxhletasi.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian adalah penentuan / analisis kandungan kadar Flavonoid dari ekstrak jahe merah.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali penelitian yaitu suhu dan waktu inkubasi.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah :

1. Rimpang jahe merah adalah tumbuhan yang diambil dari pemasok jahe asal Genuk Semarang yang diperoleh dari petani jahe di daerah Temanggung. Tumbuhan jahe sendiri mengandung berbagai zat yang pemanfaatannya banyak digunakan sebagai obat tradisional dalam pembuatan jamu dan pada penelitian ini senyawa yang dianalisis yaitu kandungan flavonoid pada ekstrak jahe.
2. Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian eksperimental ini yang dilakukan pada suhu kamar yang didiamkan beberapa hari untuk menarik senyawa flavonoid pada jahe merah.
3. Soxhletasi adalah metode ekstraksi dengan dilakukan pemanasan pada suhu 85°C untuk menarik senyawa flavonoid dari jahe merah dengan menggunakan pelarut etanol.
4. Refluks adalah metode ekstraksi dengan serbuk yang akan diekstrak direndam kedalam pelarut yang akan digunakan dan selanjutnya direfluks pada suhu 50°C beberapa jam dan setelah didapatkan residu hasil ekstraksi refluks pertama maka diekstraksi kembali dengan pelarut yang sama dengan perlakuan yang sama sampai didapatkan hasil yang diinginkan.
5. Kuersetin adalah suatu senyawa yang memiliki penyebaran luas dan kuersetin sekitar 25% terdapat dalam tumbuhan yang memiliki rumus molekul $C_{15}H_{10}O_7$

6. Rutin adalah suatu glikosida yang tersebar luas dalam tumbuhan yang memiliki rumus molekul $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$
7. Pengujian kuantitatif dengan Spektrofotomeer UV-Vis adalah pengujian secara kuantitatif dengan metode identifikasi spektrofotometer UV-Vis. Spektrum serapan ultra violet dan serapan tampak merupakan cara tunggal yang paling efektif mengidentifikasi senyawa flavonoid.
8. Pengujian kualitatif (uji warna) merupakan suatu proses identifikasi suatu senyawa kimia yang terkandung dalam sampel dengan ditamhkannya suatu reagen sampai terbentuknya suatu warna.
9. Flavonoid adalah senyawa polifenol yang memiliki 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6 yaitu cincin aromatik yang dihubungkan oleh 3 atom karbon yang dapat atau tidak membentuk suatu cincin segitiga.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam proses penelitian ini terdiri dari :

Spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV-1800), *Rotary Evaporator* RE-2000E, waterbath, alat gelas (Pyrex), blender, ayakan mesh no 40, pisau, oven, pipet tetes, pipet volume, erlenmeyer, timbangan analitis, seperangkat alat refluks, seperangkat alat soxhletasi, wadah maserasi, kertas saring Whatman, komputer pengolah data

2. Bahan

Bahan bahan yang digunakan dalam proses penelitian yang dilakukan terdiri dari :

Jahe merah (*Zingiber officinale var Rubrum*) yang diperoleh dari penyuplai bibit dari semarang, etanol (p.a), metanol (p.a), kuersetin, rutin, alumunium klorida, magesium, natrium carbonat, natrium asetat CV. Bani Usaha Mandiri, asam klorida (HCL) PT Putra Kencana, asam asetat PT Putra Kencana.

F. Alur Penelitian

1. Pembuatan Simplisia

Langkah pertama yang dilakukan yaitu pembuatan simplisia jahe merah (*Zingiber offiinale Var Rubrum*) yang diperoleh dari daerah Semarang tepatnya didaerah Genuk. Jahe merah pada awalnya dilakukan sortasi basah terlebih dahulu dipilih rimpang yang segar dan selanjutnya jahe merah dibersihkan dari pengotor dengan cara dilakukan pencucian, selanjutnya jahe merah dirajang dengan ketebalan yang diinginkan. Jahe merah yang sudah dirajang dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutupi kain berwarna hitam diatasnya, selain dikeringkan dengan sinar matahari juga dikeringkan dengan bantuan oven 50°C di Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo. Simplisia kering selanjutnya dilakukan sortasi kering dengan dilakukan pemisahan antara simplisia dengan zat pengotor yang masih tersisa dan selanjutnya simplisia dibender

agar didapat serbuk simplisia dilanjutkan dengan proses pengayakan dengan ayakan mesh no 40 (Korua, 2019).

2. Pembuatan Eksrak Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Var *Rubrum*)

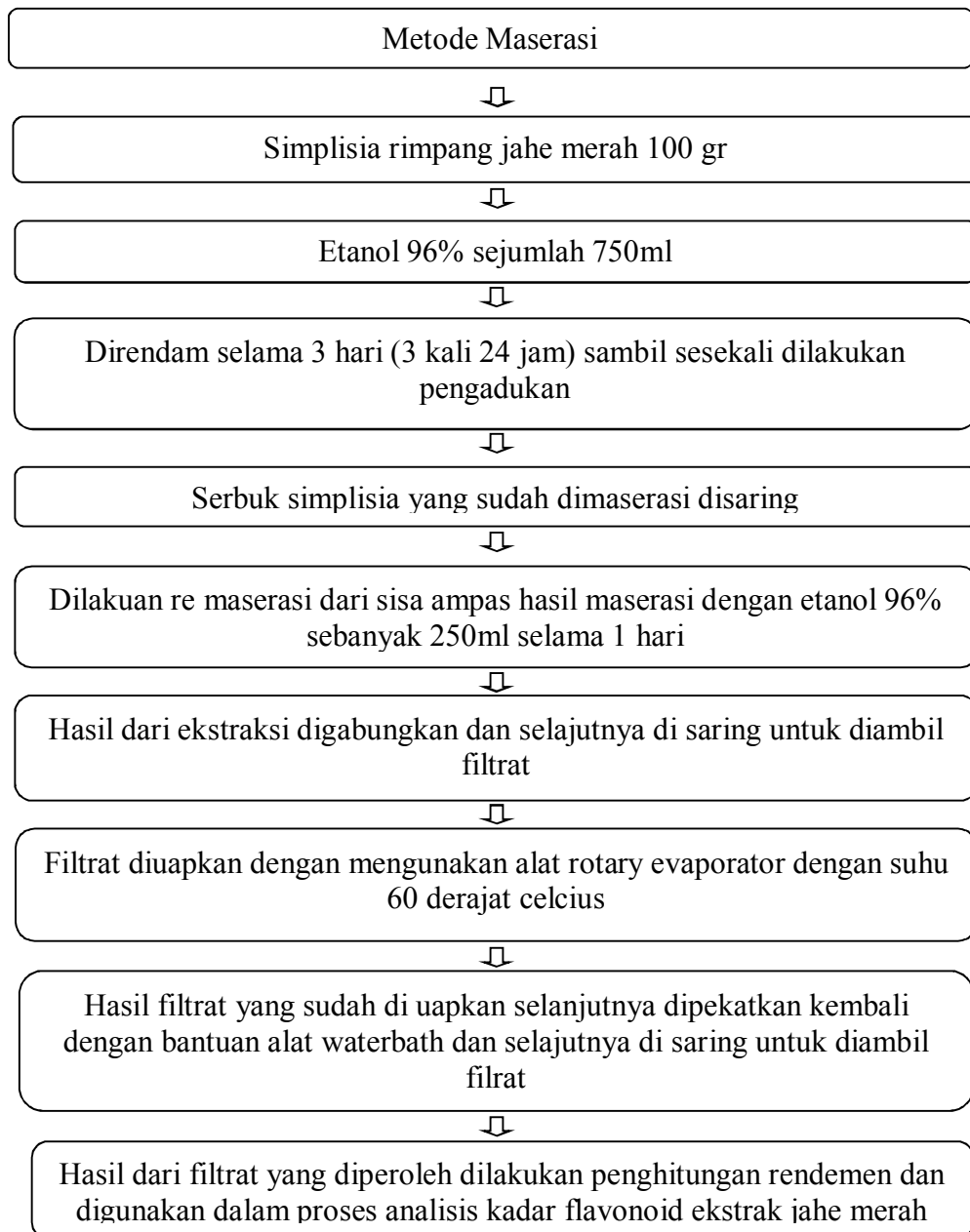
Penelitian yang dilakukan pada pembuatan ekstraksi menggunakan sampel jahe merah. Pembuatan ekstrak jahe merah menggunakan simplisia yang sebelumnya sudah dibuat dengan cara mengeringkan sampel jahe dan sudah dihaluskan serta dilakukan pengayakan dengan ayakan mesh. Proses ekstraksi yang dilakukan dengan menggunakan tiga variasi metode ekstraksi yaitu maserasi, refluks dan soxhletasi dengan pelarut yang digunakan yaitu etanol 96%, pemilihan metode ekstraksi ini bertujuan untuk menganalisis kadar flavonoid dari sampel yang diekstrak untuk mengetahui masing masing kadar zat dicari dan dianalisis metode mana yang paling efektif dalam proses penarikan senyawa flavonoid apabila diberikan perlakuan ekstraksi secara panas dan dingin, untuk metode ekstraksi secara dingin yaitu dengan cara maserasi dan dengan cara panas yakni dengan cara refluks dan soxhletasi.

Proses ekstraksi dilakukan di laboratorium Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo dengan cara masing masing simplisia yang sudah dihaluskan ditimbang dengan berat masing masing 100 gr dan 50 gr, adanya perbedaan sampel dalam proses ekstraksi dikarenakan karena keterbatasan sampel yang didapat sehingga adanya sedikit perbedaan jumlah sampel digunakan tetapi tetap menggunakan perbandingan pelarut

sesuai dengan acuan dan dilarutkan dengan pelarut etanol 96%, setelah di filtrasi selanjutnya hasil yang didapat diuapkan dengan alat *rotary evaorator* sampai diperoleh ekstrak kental yang diinginkan.

a. Maserasi

Serbuk simplisia yang sudah diperoleh ditimbang sebanyak 100gr dan diekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 750ml selama 3×24 jam (3 hari) dengan sesekali dilakukan pengadukan setiap 6 jam sekali agar dalam penarikan senyawa flavonoid yang terkandung dalam simplisia dapat ditarik secara optimal. Filtrat yang diperoleh dari hasil ekstraksi selanjutnya disaring dengan kertas wathman no 40 dan setelah dilakukan penyaringan filtrat di evaporator pada suhu 60°C selama beberapa jam hingga diperoleh ekstrak yang kental dan konstan (utami *et al.*, 2020) .

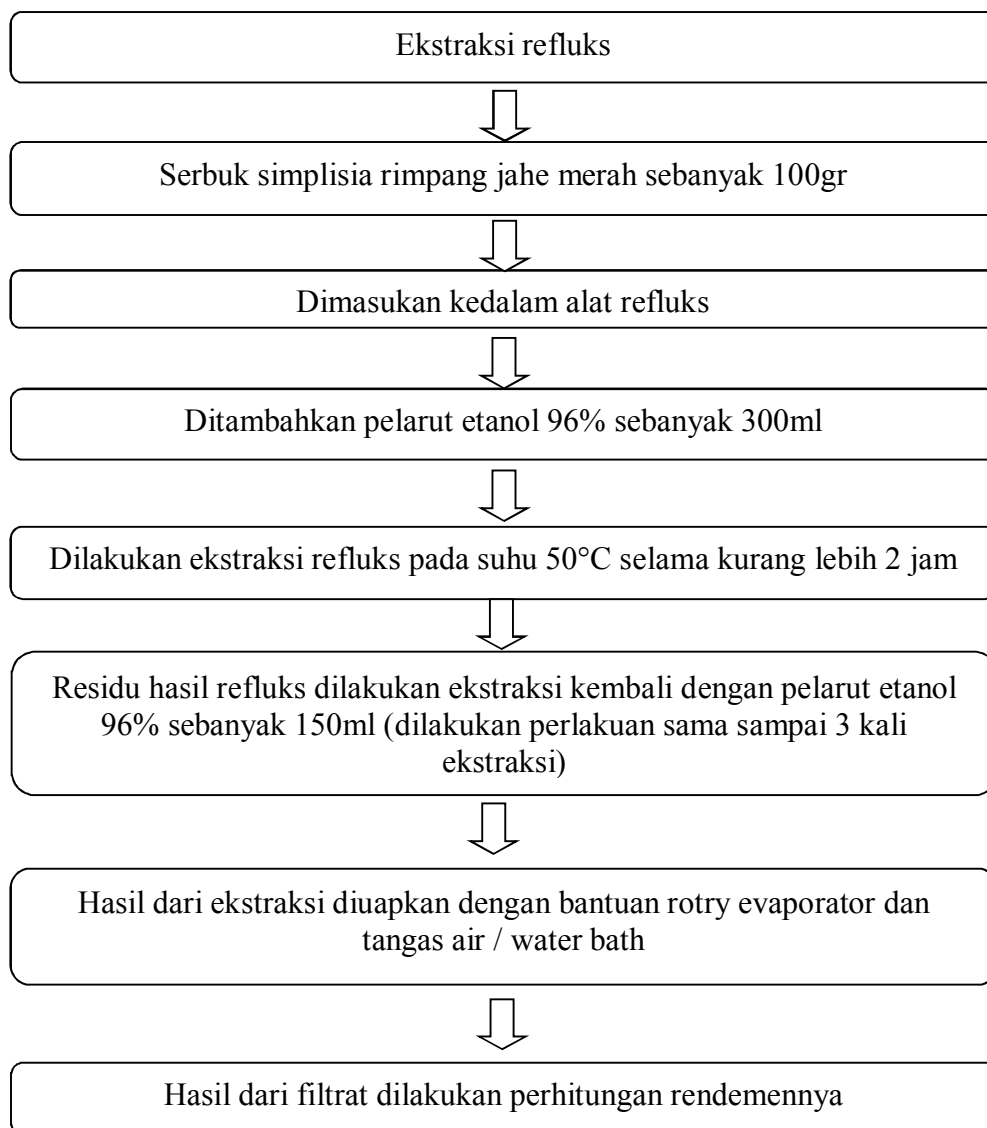


Bagan 3.1 Metode Maserasi

b. Refluks

Sebanyak 100gr serbuk simplisia jahe merah dimasukkan kedalam alat refluks dan kemudian dimasukan pelarut etanol 96% sebanyak 300ml,. Setelah serbuk simplisia terendam oleh pelarut

selanjutnya dilakukan proses ekstraksi refluks pada suhu 50°C selama 2 jam. Hasil dari sampel refluks pertama diekstraksi kembali dengan pelarut etanol sebanyak 150ml dengan perlakuan yang sama (refluks pada suhu 50°C selama 2 jam) dan dilakukan ekstraksi terus menerus dengan residu yang sama dengan dilakukan perlakuan penambahan pelarut sebanyak 150ml sampai dengan filtrat yang dihasilkan mendapatkan hasil yang konstan (dilakukan proses ekstraksi dengan metode refluks sebanyak 3 kali). Ekstrak yang sudah didapat diuapkan dengan alat rotary evaporator dan dilanjutkan dengan penangas air / water bath untuk mendapatkan ekstrak kental (utami et *al.*, 2020).

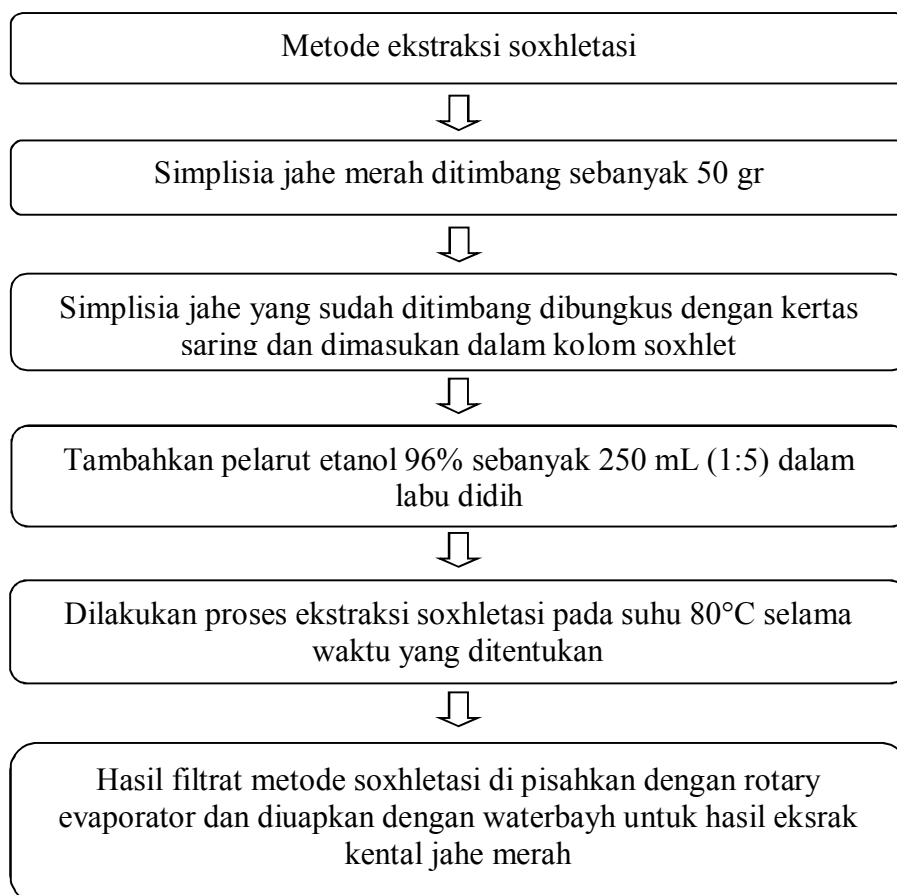


Bagan 3.2 Metode Refluks

c. Soxhletasi

Serbuk simplisia jahe merah ditimbang sejumlah 50 gr selanjutnya dibungkus menggunakan kertas saring dan dimasukkan kedalam kolom soxhlet. Kolom soxhlet ditambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1 : 5 kedalam labu didih 250 mL. Labu

yang sudah berisi sampel dirangkai dengan seperangkat alat ekstraksi soxhletasi dengan suhu 80°C selama 150 menit. Hasil ekstrak dari soxhletasi selanjutnya dipisahkan dan diuapkan dengan *rotary evaporator* dan diuapkan kembali menggunakan waterbath (Wijaya et al., 2019).



Bagan 3.3 Metode Soxhletasi

3. Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Ekstrak Jahe Merah

a. Uji Kualitatif (Uji Warna) Flavonoid

Simplisia atau ekstrak sebanyak 500 mg ditimbang dan dimasukkan kedalam cawan lalu ditambahkan 2 mL etanol 70% kemudian diaduk, tambahkan serbuk magnesium 0,5 g dan 3 tetes

HCL pekat. Hasil dari identifikasi menunjukkan hasil positif akan menunjukkan warna kuning sampai merah (Rahmadani et al., 2015a).

b. Uji Bebas Etanol

Ekstrak yang diperoleh dari masing masing metode ekstraksi diambil dan ditambahkan dengan 2 mL kalium Dikromat ditambahkan dengan 3 tetes asam sulfat pekat. Hasil uji menunjukkan reaksi warna dengan menunjukkan warna biru menandakan ekstrak masih memiliki kandungan senyawa etanol sedangkan warna coklat tidak terkandung senyawa etanol dalam ekstrak (Vifta et,al., 2021).

c. Pengujian Kuantitatif Senyawa Flavonoid dengan Pembanding Kuersetin

1) Pembuatan larutan induk kuersetin

Larutan induk dibuat dengan 10 mg kuersetin dilarutkan dengan 10 ml etanol pa dari pengenceran kuersetin sebanyak 1000ppm

2) Pembuatan larutan baku kuersetin

Larutan baku kuersetin dibuat dari larutan induk yang sudah diperoleh dan yang sudah diencerkan diambil larutan standar dengan konsentrasi 40 ppm, dan 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm
Rumus pengenceran = $V1.C1 : V2.C2$

3) Penentuan panjang gelombang maksimal kuersetin

Panjang gelombang maksimal ditentukan dengan mengambil larutan kuersetin 50 ppm sebanyak 1 mL. Larutan

kuersetin pada konsentrasi yang digunakan direaksikan dengan 1 mL $AlCl_3$ 10% dan 8 ml asam asetat 5% dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dengan pembacaan pada rentang panjang gelombang 400-500nm .

4) Penentuan *operating time* kuersetin

Larutan kuersetin dengan konsentrasi yang digunakan diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi lalu direaksikan dengan 1 mL larutan $AlCl_3$ 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Larutan dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimum dengan waktu 30 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

5) Penentuan larutan kurva baku kuersetin

Larutan seri dibuat dengan bahan kuersetin sebagai bahan baku standar dengan konsentrasi 40, 50, 60, 70, dan 80 ppm. Sebanyak 1 mL larutan seri kadar dari tiap-tiap konsentrasi dimasukkan dan direaksikan dengan 1 mL $AlCl_3$ 10% dan 8 mL asam asetat 5% dan didiamkan selama 30 menit dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dan waktu operasional

6) Penentuan kadar flavonoid total

Ekstrak jahe merah yang sudah diperoleh, ketiganya ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan kedalam 10 mL etanol dan diperoleh konsentrasi 1000ppm lalu diencerkan menjadi

500ppm. Larutan yang sudah diencerkan dipipet sebanyak 1 mL lalu ditambahkan 1 mL larutan AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Sampel didiamkan selama kurang lebih selama 30 menit pada suhu kamar kemudian dilakukan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang maksimum dan waktu operasional yang telah diperoleh (Vifta *et al.*, 2021), analisis kadar flavonoid total dari setiap ekstrak yang diperoleh dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk memperoleh kadar flavonoid total pada sampel yang digunakan. Penentuan nilai flavonoid akhir dilakukan berdasarkan formula (Rumoro *et al.*, 2019) yaitu :

$$\text{Flavonoid Total} = \frac{m}{g} = \frac{Y \times N \times V}{W}$$

Keterangan :

Y = konsentrasi flavonoid contoh yang dihitung dengan menggunakan persamaan kurva standard (mg g^{-1})

N = nilai pengenceran

V = volume hasil ekstraksi (mL)

W = berat serbuk jahe (g)

d. Pengujian Kuantitatif Senyawa Flavonoid dengan Pembanding Rutin

1) Pembuatan larutan induk rutin

Larutan induk rutin dibuat dengan menimbang 10 mg rutin dan dilarutkan dengan metanol pa hingga volume 10 mL.

2) Pembuatan larutan baku rutin

Larutan standar rutin 1000ppm dibuat dengan menimbang 10 mg rutin dan dilarutkan dengan menggunakan metanol pa hingga volume 10 mL dan diencerkan. Larutan induk dilakukan pengenceran hingga menghasilkan konsentrasi 90, 100, 110, 120, dan 130 ppm

Rumus pengenceran = $V1.C1 : V2.C2$

3) Penentuan panjang gelombang maksimal rutin

Larutan baku rutin dengan konsentrasi 100 ppm diambil sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan dengan 1,5 mL metanol pa kemudian ditambahkan 0,1 mL alumunium klorida 10% dan natrium asetat 1M dengan konsentrasi sama, lalu ditambahkan dengan 2,8 mL aquadest dan larutan diinkubasi kurang lebih selama 30 menit pada suhu kamar. Larutan yang sudah diinkubasi dan sudah siap dilakukan pengecekan selanjutnya dicek dengan spektrofotometer UV-Vis dengan pembacaan mulai dari 400 – 500nm untuk mengetahui panjang gelombang maksimal dari pembanding rutin

4) Penentuan *operating time* rutin

Larutan baku 100 ppm dipipet sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan dengan 1,5 mL metanol pa lalu masukan alumunium klorida 10% dan natrium asetat 1M masing masing sebanyak 0,1 mL, setelah selesai selanjutnya ditambahkan dengan aquadest

sebanyak 2,8 mL. Setelah larutan siap, larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan dicek oprating time dengan alat spektrofotometer UV=Vis dengan pembacaan 400-500nm selama 30 menit sampai didapatkan opratingtime yang stabil.

5) Penentuan larutan kurva baku rutin

Baku rutin dengan konsentrasi 90, 100, 110, 120, 130 ppm dari tiap tiap konsentrasi diambil sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan dengan pelarut metanol pa sebanyak 1,5 mL. Setelah metanol ditambahkan selanjutnya ditambahkan dengan alumunium klorida 10% dan natrium asetat 1M masing masing sebanyak 0,1 mL dan ditambahkan lagi dengan aquadest dengan jumlah sebanyak 2,8 mL. Larutan yang sudah dicampurkan selanjutnya di inkubasi selama kurang lebih 30 menit di ruangan dengan suhu kamar, setelah selesai di lakukan inkubasi tahap selanjutnya dlakukan pembacaan absorbans dari tiap tiap konsentrasi dengan alat spektrofotometer UV-Vis, pembacaan absorbansi dibaca dari rentang 400 – 500 nm

6) Penentuan kadar flavonoid total pada ekstrak jahe merah

Sebanyak 10 mg ekstrak dari tiap-tiap ekstaksi jahe merah dilarutkan dengan metanol sampai dengan 10 mL, larutan yang diperoleh dipipet sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan dengan 1,5 mL metanol pa lalu digojog dan ditambahkan dengan 0,1 mL alumunium klorida 10% dan ditambahkan lagi dengan 0,1 mL

natrium asetat dengan konsentrasi 1M, selanjutnya larutan ditambahkan dengan aquadest sebanyak 2,8 mL. Larutan yang sudah dicampur digojog sampai tercampur secara homogen dan didiamkan / diinkubasi kurang lebih selama 30 menit diruang suhu kamar. Larutan yang telah selesai diinkubasi dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang maksimum dan pengecekan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Wahyulianingsih et al., 2016). Penentuan kandungan flavonoid total di hitung dengan menggunakan rumus sesuai dengan (Rumoro et.al., 2019) :

$$\text{Flavonoid Total} = \frac{m}{g} = \frac{Y \times N \times V}{W}$$

Keterangan :

Y = konsentrasi flavonoid contoh yang dihitung dengan menggunakan persamaan kurva standard (mg g⁻¹)

N = nilai pengenceran

V = volume hasil ekstraksi (mL)

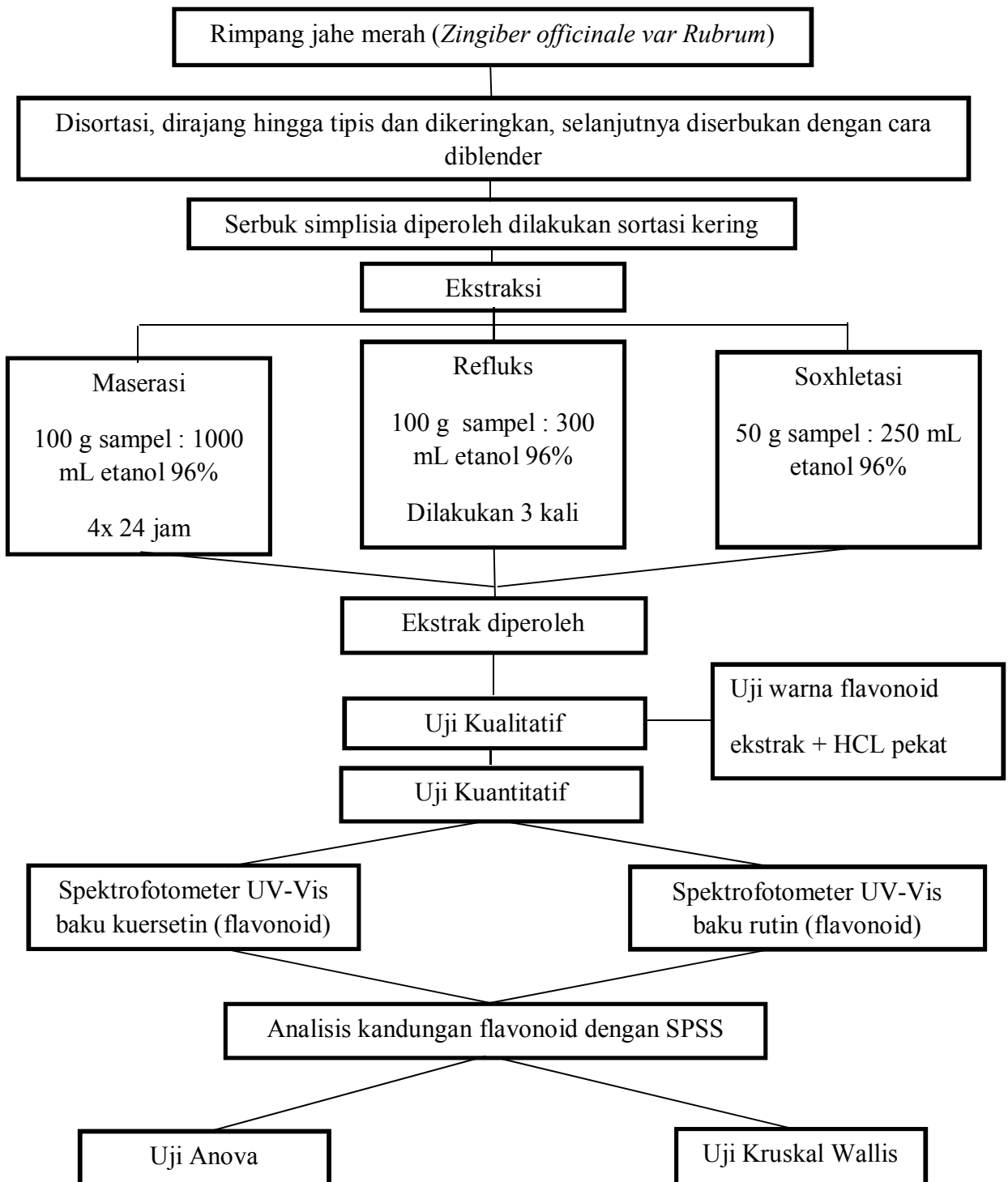
W = berat serbuk jahe (g)

G. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan metode statistik menggunakan SPSS 16 dengan bantuan perangkat windows dengan menggunakan dua parameter yang berbeda yaitu uji Anova dan uji Kruskal Wallis. Uji Anova digunakan untuk menganalisis data hasil perhitungan kadar flavonoid dengan pembandingan kuersetin. Sedangkan Uji Kruskal Wallis digunakan untuk

menganalisis kadar hasil perhitungan kadar flavonoid dengan pembandingan rutin.

H. Prosedur Penelitian



Bagan 3.4 Prosedur Penelitian