

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium untuk mengidentifikasi kandungan senyawa dalam ekstrak daun kencur (*Kaempferia galanga* L.), mengevaluasi karakteristik standarisasi ekstrak daun kencur (*Kaempferia galanga* L.), dan mengetahui kadar flavonoid total ekstrak daun kencur (*Kaempferia galanga* L.). Identifikasi kadar flavonoid total ekstrak daun kencur (*Kaempferia galanga* L.) menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan pembanding kuersetin.

B. Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia, dan Laboratorium Instrument Farmasi Universitas Ngudi Waluyo. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah ekstrak daun kencur (*Kaempferia galanga* L.) yang diperoleh dari Madura.

D. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi operasional

Variabel	Definisi operasional	Metode	Hasil ukur	Skala ukur
Ekstrak daun kencur (<i>Kaempferia galanga</i> L.)	Hasil penyarian daun kencur menggunakan metode ekstraksi maserasi dan etanol 70% yang dilakukan sebanyak dua kali yang diperoleh dari pulau Sapudi Kabupaten Sumenep Madura.			
Standarisasi ekstrak	Standarisasi ekstrak adalah serangkaian prosedur yang hasilnya merupakan nilai parameter konstan dan sesuai dengan yang ditetapkan.			
Susut pengeringan	Susut pengeringan adalah penurunan/penyusutan ekstrak pada suhu 105°C selang waktu 1 jam	Gravimetri	Persen (%)	Rasio
Kadar senyawa larut air	Kadar senyawa larut air adalah jumlah senyawa yang dapat larut dalam pelarut air	Gravimetri	Persen (%)	Rasio
Kadar senyawa larut etanol	Kadar senyawa larut etanol adalah jumlah senyawa yang dapat larut dalam pelarut etanol	Gravimetri	Persen (%)	Rasio
Kadar abu total	Kadar abu total adalah jumlah kontaminan dan kandungan mineral yang terdapat dalam ekstrak pada pengujian suhu 600°C	Gravimetri	Persen (%)	Rasio

Kadar abu yang tidak larut asam	Kadar abu tidak larut asam adalah jumlah kontaminan yang tidak larut asam yang terdapat dalam ekstrak pada pengujian suhu 600°C	Gravimetri	Persen (%)	Rasio
Kadar air	Kadar air adalah jumlah kandungan air yang terdapat dalam ekstrak	Gravimetri	%MC	Rasio
Kadar flavonoid total.	Hasil pengukuran konsentrasi flavonoid total yang diekstraksi dari daun kencur dengan metode spektrofotometri UV-Vis.	Spektrofotometri	Persen (%)	Rasio

E. Variabel Penelitian

Variabel bebas adalah variabel yang dapat mempengaruhi atau menjadi sebab perubahannya variabel terikat. Adapaun variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, karena adanya variabel bebas.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian adalah serbuk simplisia daun kencur, etanol 70% dan 95%, ekstrak daun kencur, asam sulfat (H_2SO_4) encer P, kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$), air kloroform LP, HCl pekat, serbuk Mg, natrium hidroksida (NaOH) 10%, n-butanol: asam asetat: air, penampak noda $AlCl_3$, HCl encer, kuersetin, etanol p.a, air suling (aquadest), aluminium (III) klorida ($AlCl_3$) 2%, asam asetat (CH_3COOH) 5%, aluminium foil, kertas perkamen, kertas saring. Alat yang diperlukan untuk penelitian adalah ayakan, oven, batang

pengaduk, bejana maserasi, blender, penyaring *buchner*, cawan porselin, corong, gelas arloji, gelas erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, *chamber*, krus silikat, inkubator, kuvet kaca, mikropipet, labu ukur, pipet volume, tabung reaksi, plat KLT silica gel 60 GF 254, *rotary evaporator*, *moisture balance*, spektrofotometer UV-Vis, dan timbangan analitik.

2. Prosedur Kerja

a. Pembuatan Simplisia Daun Kencur

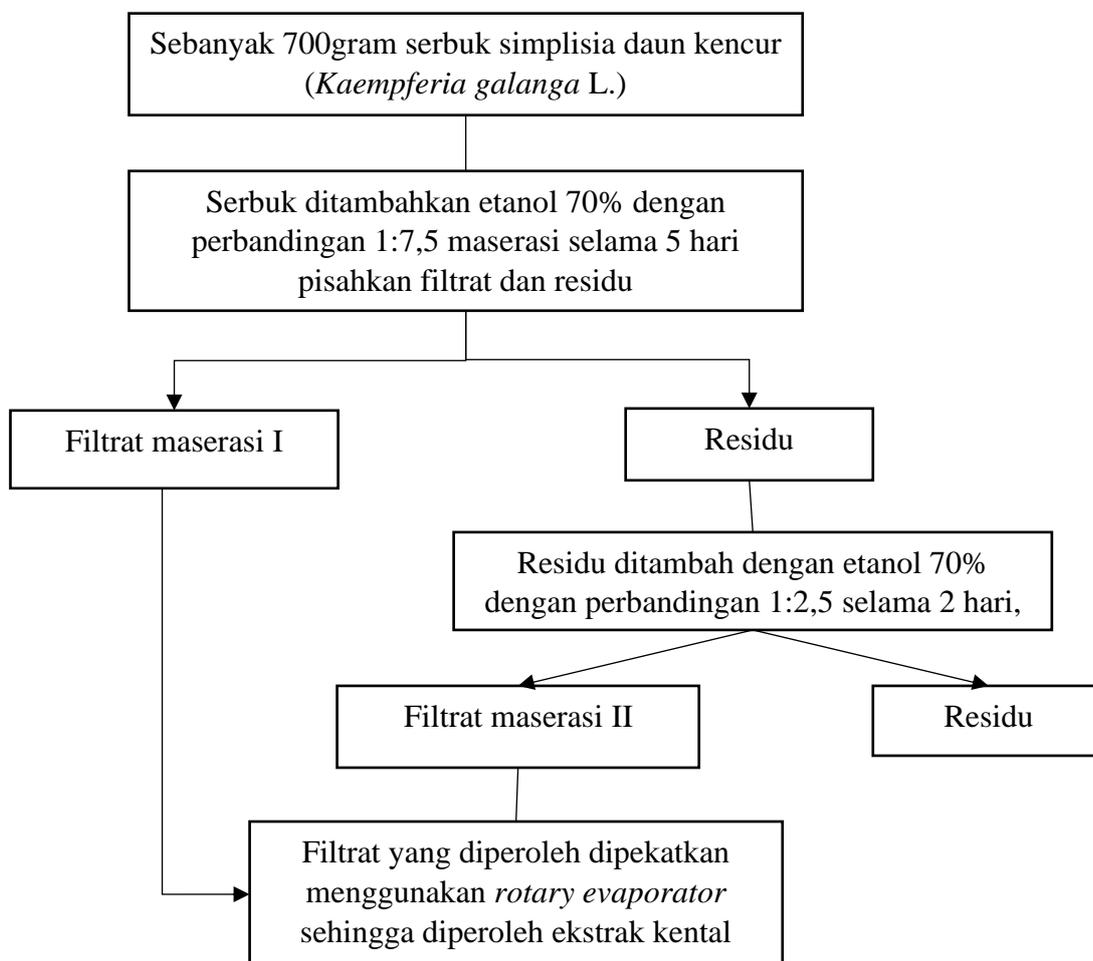
Daun kencur segar yang berwarna hijau tua dari daerah Madura dilakukan sortasi basah dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun. Daun kencur dilakukan pengeringan dengan cara diangin-anginkan. Simplisia kering yang diperoleh dilakukan sortasi kering (daun yang rusak) kemudian dibuat serbuk dengan bantuan blender sampai halus, diayak menggunakan ayakan nomor 60 dan disimpan dalam wadah tertutup.

b. Pembuatan Ekstrak Daun Kencur

Sejumlah 700g serbuk simplisia daun kencur dilakukan ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 70% 7L dengan perbandingan 1:7,5 selama 5 hari terlindung dari cahaya, kemudian dilakukan pemisahan antara ampas dan filtrat. Ampas simplisia daun kencur dilakukan ekstraksi kembali dengan etanol 70% perbandingan 1:2,5 selama 2 hari terlindung dari cahaya, kemudian dipisahkan antara ampas dan filtrat. Filtrat yang diperoleh dipekatan menggunakan *rotary evaporator* sehingga menghasilkan ekstrak kental.

Ekstraksi dilakukan perhitungan rendemen dengan cara, rendemen =

$$\frac{\text{berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{berat simplisia awal}} \times 100\%$$



Gambar 3.1 Bagan proses ekstraksi maserasi daun kencur (*Kaempferia galanga L.*)

c. Pengujian Bebas Etanol

Pengujian bebas etanol dilakukan dengan mereaksikan sampel dengan kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$) dalam suasana asam, jika sampel tidak mengandung etanol atau bebas etanol maka akan terbentuk warna campuran dari larutan ekstrak dan larutan kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$) yang

ditambahkan asam sulfat (H₂SO₄) tetapi jika larutan mengandung etanol maka akan terbentuk warna biru.

d. Standarisasi Ekstrak Daun Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

1) Parameter spesifik

a) Uji organoleptik

Pengamatan secara fisik dengan menggunakan panca indra dalam mendiskripsikan bentuk, bau, rasa, dan warna

b) Uji kadar senyawa larut air

Sejumlah 1g ekstrak daun kencur dimaserasi selama 24 jam dengan 20mL air kloroform LP menggunakan labu ukur, sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Selanjutnya dipisahkan filtrat dan residu, filtrat yang diperoleh diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, kemudian dipanaskan residu pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Pengujian dilakukan replikasi sebanyak tiga kali kemudian kadar senyawa larut air dihitung terhadap bahan uji yang dinyatakan dalam persen (Kemenkes RI, 2017). Kadar senyawa larut air dilakukan perhitungan kadar pada ekstrak dengan cara, kadar senyawa yang larut air =

$$\frac{(\text{berat awal} + \text{berat cawan}) - (\text{berat cawan} + \text{berat konstan})}{(\text{berat awal} + \text{berat cawan})} \times 100\%$$

c) Uji kadar senyawa yang larut etanol

Sejumlah 1g ekstrak daun kencur dimaserasi selama 24 jam dengan 20mL etanol (95%) menggunakan labu ukur sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Selanjutnya dipisahkan filtrat dan residu secara cepat untuk menghindari penguapan etanol, kemudian filtrat yang diperoleh diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, selanjutnya dipanaskan residu pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Pengujian dilakukan replikasi sebanyak tiga kali kemudian kadar senyawa yang larut etanol dihitung terhadap bahan uji yang dinyatakan dalam persen (Kemenkes RI, 2017). Kadar senyawa yang larut etanol dilakukan perhitungan kadar pada ekstrak dengan cara, kadar senyawa yang larut dalam etanol =

$$\frac{(berat\ awal+berat\ cawan)-(berat\ cawan+berat\ konstan)}{(berat\ awal+berat\ cawan)} \times 100\%$$

2) Parameter non spesifik

a) Uji susut pengeringan dengan metode gravimetri

Sebanyak 1g ekstrak daun kencur dalam krus porselin tertutup yang sebelumnya sudah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara diratakan dengan menggoyangkan krus hingga membentuk lapisan setebal 5mm–10mm, kemudian dilakukan pengeringan dalam oven pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Selanjutnya dibiarkan dingin dalam eksikator.

Pengujian dilakukan replikasi sebanyak tiga kali kemudian susut pengeringan dihitung terhadap bahan uji yang dinyatakan dalam persen (Kemenkes RI, 2017). Susut pengeringan dilakukan perhitungan kadar pada ekstrak dengan cara, susut pengeringan =

$$\frac{\text{berat awal} - \text{berat konstan}}{\text{berat awal}} \times 100\%$$

b) Uji kadar air dengan metode gravimetri

Sebanyak 2g ekstrak daun kencur dalam wadah yang telah ditara, kemudian dimasukkan pada alat *moisture balance* tunggu sampai hasil diperoleh.

c) Uji kadar abu total dengan metode gravimetri

Sebanyak 1,5g ekstrak daun kencur dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara dilakukan pemijaran perlahan-lahan hingga arang habis, dan dibiarkan dingin hingga bobot konstan. Percobaan direplikasi sebanyak tiga kali kemudian dihitung kadar abu total dihitung terhadap bahan uji yang dinyatakan dalam persen (Kemenkes RI, 2017). Kadar abu total dilakukan perhitungan kadar pada ekstrak dengan cara, kadar abu total =

$$\frac{(\text{berat awal} + \text{berat kurs}) - (\text{berat kurs} + \text{berat konstan})}{(\text{berat awal} + \text{berat kurs})} \times 100\%$$

d) Uji kadar abu yang tidak larut dalam asam dengan metode gravimetri

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu dilakukan pemanasan sampai mendidih dengan 12,5mL asam sulfat encer P selama 5 menit, kemudian bagian yang tidak larut dengan asam

dikumpulkan dengan cara menyaring menggunakan kertas kaca masir atau kertas saring bebas abu, selanjutnya dilakukan pencucian dengan air panas, dan dipijarkan pada suhu $800 \pm 25^\circ\text{C}$ hingga bobot tetap. Percobaan direplikasi sebanyak tiga kali kemudian dihitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan uji yang dinyatakan dalam persen (Kemenkes RI, 2017). Kadar abu yang tidak larut asam dilakukan perhitungan kadar pada ekstrak dengan cara, kadar abu yang tidak larut dalam asam =

$$\frac{(\text{berat awal} + \text{berat kurs}) - (\text{berat kurs} + \text{berat konstan})}{(\text{berat awal} + \text{berat kurs})} \times 100\%$$

e. Identifikasi Flavonoid

1) Uji Kualitatif dengan Metode Skrining Fitokimia dan Metode KLT

a) Uji *Wilstater*

Sebanyak 1mL sampel direaksikan dengan 2-4 tetes HCl pekat dan sedikit serbuk logam Mg. Perubahan warna terjadi diamati dari kuning tua menjadi *orange* (Harborne, 1987).

b) Uji *Bate-Smith*

Sebanyak 1mL sampel direaksikan dengan HCl pekat lalu dipanaskan di atas penangas air. Reaksi positif jika memberikan warna merah (Harborne, 1987).

c) Uji dengan NaOH 10%

Sebanyak 1mL direaksikan dengan pereaksi NaOH 10% perubahan warna yang spesifik menunjukkan reaksi positif (Harborne, 1987).

d) Uji Kromatografi Lapis Tipis

Pada uji KLT digunakan plat KLT silica gel 60 GF 254 yang sudah diaktivasi terlebih dahulu dengan cara dioven selama 10-15 menit dengan suhu 110°C, kemudian digambarkan garis dengan pensil di bawah plat (1 cm dari tepi bawah dan 1 cm dari tepi atas plat), garis bagian bawah diberikan penandaan menggunakan jarum untuk menunjukkan posisi awal totolan. Fase gerak yang digunakan untuk pengujian flavonoid adalah n-butanol: asam asetat: air (4:1:5), kemudian dilakukan penjenuhan dalam *chamber*, penjenuhan ini berfungsi untuk menyamakan tekanan dalam *chamber*. Sejumlah 50mg ekstrak kental daun kencur dilarutkan dengan etanol 2mL kemudian ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada plat KLT, dan dilakukan proses elusi pada *chamber* yang sudah berisi fase gerak selama ± 10 menit atau sampai fase gerak mencapai garis batas atas yang sudah ditentukan. Selanjutnya dikeluarkan plat, reaksi positif jika menunjukkan warna kuning kehijauan. Jika noda tidak terlihat dapat menggunakan penampak noda AlCl_3 10%, perhitungan nilai

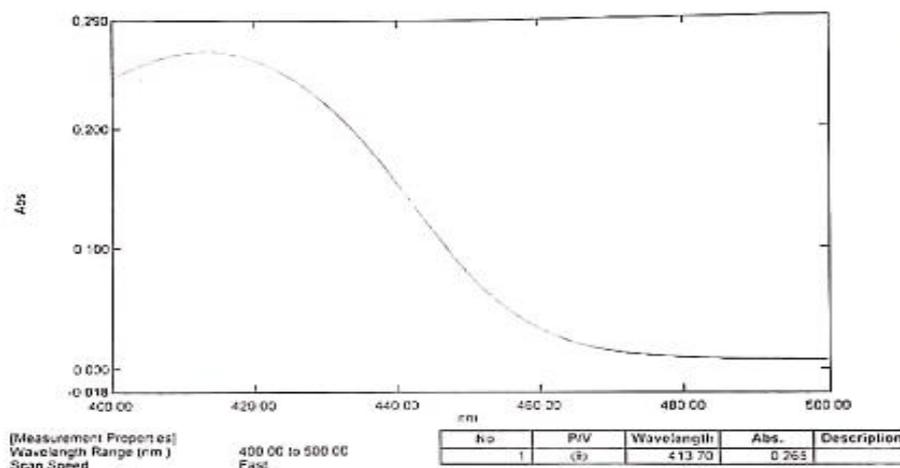
Rf yaitu perbandingan jarak noda dengan jarak eluen (fase gerak) (K. Anam, 2015).

2) Uji Kuantitatif Kadar Flavonoid

a) Prosedur penentuan panjang gelombang maksimum (λ) kuersetin

Sebanyak 1,5mg kuersetin dilarutkan dalam etanol p.a *add* 25mL sehingga diperoleh 60ppm, 1mL larutan kuersetin direaksikan dengan 1mL $AlCl_3$ 2% dan 8mL CH_3COOH 5%, di dalam tabung reaksi, kemudian didiamkan (inkubasi) selama 30 menit, selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi dari larutan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-500nm (Ipand *et al.*, 2016).

Penetapan ini dilakukan untuk mengevaluasi serapan maksimum senyawa, panjang gelombang kuersetin yang diperoleh pada pengukuran yaitu 413,70nm dengan absorbansi 0,265 pada *range* 400-500nm. Hal ini tidak jauh berbeda dengan hasil pengukuran panjang gelombang yang dilakukan oleh Asmorowati dan Lindawati (2019) yaitu 413,60nm.



Gambar 3.2 Penentuan panjang gelombang maksimal kuersetin

b) Penentuan *operating time* kuersetin

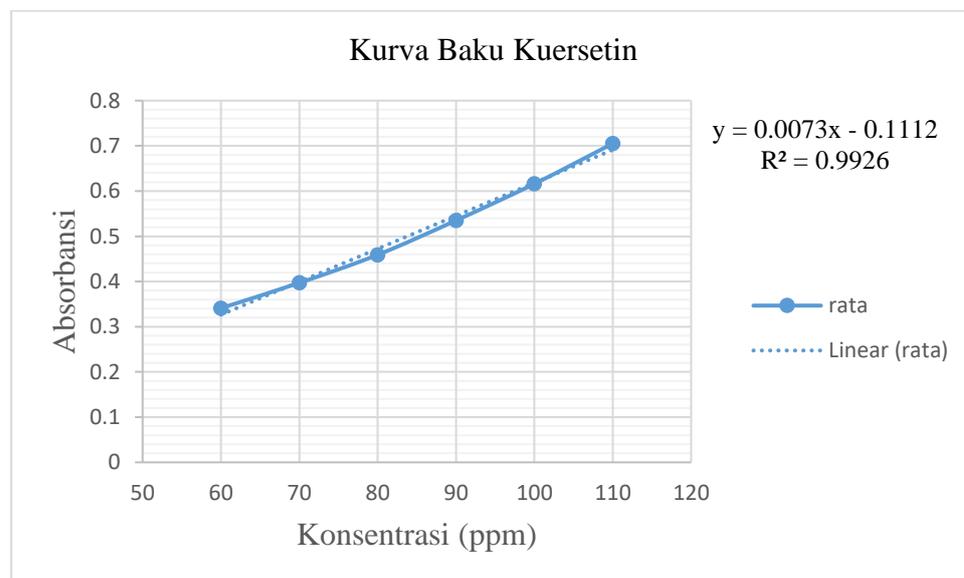
Sebanyak 1mL dari larutan kuersetin 60ppm direaksikan dengan 1mL AlCl_3 2% dan 8mL CH_3COOH 5%, di dalam tabung reaksi, kemudian didiamkan (inkubasi) selama 30 menit, selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi dari larutan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dengan interval waktu 2 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Ipand *et al.*, 2016).

Penentuan *operating time* dilakukan untuk mengevaluasi waktu suatu senyawa bereaksi membentuk senyawa kompleks yang stabil. Selama pengukuran sebaiknya absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer UV-Vis antara 0,2-0,8. Pada penentuan *operating time* stabil pada menit ke-4 sampai menit ke-22 dengan absorbansi 0,253.

c) Penentuan kurva baku kuersetin

Sebanyak 25mg kuersetin (pembanding) dilarutkan *add* 25mL etanol p.a sebagai larutan stok 1000 ppm, kemudian dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 60ppm, 70ppm, 80ppm, 90ppm, 100ppm, dan 110ppm sebagai larutan pembanding. Sebanyak 1mL larutan kuersetin dari berbagai konsentrasi direaksikan dengan 1mL AlCl₃ 2% dan 8mL CH₃COOH 5% di dalam tabung reaksi, kemudian diukur serapannya selama *operating time*, dan pada panjang gelombang maksimal yang diperoleh dari pengukuran sehingga diperoleh kurva standar kuersetin (Ipand *et al.*, 2016).

Penentuan kurva baku dapat dikatakan linier jika konsentrasi dengan absrobansi berbanding lurus, artinya semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi pula nilai absorbansi yang terukur. Hubungan antara konsentrasi dan absorbansi dinyatakan dengan nilai r (koefisien korelasi), yang apabila nilai r mendekati 1 maka memiliki hubungan kuat (Suharyanto & Hayati, 2021). Pada penentuan kurva baku kuersetin diperoleh nilai persamaan regresi linier yaitu $y = 0,0073x - 0,1112$ dengan nilai r sebesar 0,9963. Persamaan ini dapat digunakan untuk menentukan kadar senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun kencur (*Kaempferia galanga* L.).



Gambar 3.3 Grafik kurva baku kuersetin pada pengukuran panjang gelombang 413,70nm

- d) Penentuan kadar flavonoid total ekstrak daun kencur (*Kaempferia galanga* L.)

Sebanyak 10mg ekstrak daun kencur dilarutkan *add* 10mL etanol p.a sehingga diperoleh 1000 ppm, kemudian 1mL larutan sampel direaksikan dengan 1mL AlCl₃ 2% dan 8mL CH₃COOH 5% di dalam tabung reaksi. Selanjutnya diukur serapannya dengan panjang gelombang dari larutan pembanding (Ipand *et al.*, 2016).

G. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa nilai absorbansi dari ekstrak daun kencur (*Kaempferia galanga* L.) dengan pembanding kuersetin. Data konsentrasi dan absorbansi dari pembanding diolah menggunakan *microsoft excel* sehingga menghasilkan kurva dengan regresi linier. Kadar flavonoid total dihitung

menggunakan regresi linier dari kurva kalibrasi kuersetin yang telah diukur sebelumnya dengan rumus: $Y = a + bX$ dimana nilai Y = nilai absorbansi, sedangkan X = kadar flavonoid