

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium untuk menentukan pelarut mana yang menghasilkan kadar fenolik dan flavonoid total paling besar dari ekstrak daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.). Penelitian ini dilakukan dengan mengekstrak daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.) menggunakan tiga variasi pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda yaitu metanol, etil asetat dan n-heksana yang kemudian dilanjutkan dengan penentuan kadar total fenolik dan flavonoid dari ekstrak daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.).

B. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Mataram dan Laboratorium Farmakokimia serta Laboratorium Penelitian Universitas Mataram.

C. Subjek Penelitian

Populasi dan sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu tanaman renggak (*Amomum dealbatum*) yang diperoleh dari Desa Mekar Sari, Kecamatan Gunung Sari, Kabupaten Lombok Barat, NTB. Bagian tanaman yang digunakan adalah bagian daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.).

D. Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian mengenai pengaruh perbedaan pelarut terhadap kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.) adalah :

1. Pelarut yang digunakan pada penelitian adalah tiga jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda diantaranya metanol, etil asetat dan n-heksana.
2. Ekstrak merupakan sediaan yang diperoleh dengan melakukan ekstraksi senyawa aktif dari simplisia daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.) menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian pelarut diuapkan dan serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang ditetapkan (Dominica & Handayani, 2019).
3. Kadar fenolik total merupakan kadar senyawa fenolik dalam sampel yang dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat atau *Gallic Acid Equivalent* (GAE) menggunakan perhitungan TPC (*Total Phenolic Content*), dimana nilai C (kadar fenol total larutan) atau sumbu x didapatkan dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam sumbu y pada persamaan regresi linier standar asam galat.
4. Kadar flavonoid total merupakan kadar flavonoid dalam sampel yang dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin (EQ) menggunakan perhitungan TFC (*Total Flavonoid Content*) dimana kadar flavonoid dalam sampel (sumbu x) diketahui dengan memasukkan absorbansi sampel ke dalam (sumbu y) pada persamaan regresi linier kuersetin.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang tercakup dalam hipotesis penelitian dan berpengaruh atau dapat mempengaruhi variabel tergantung. Pada penelitian ini variabel bebasnya adalah jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi yaitu diantaranya metanol, etil asetat dan n-heksana.

2. Variabel Tergantung

Variabel yang tercakup dalam hipotesis penelitian dan keragamannya dipengaruhi oleh variabel lain. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.) menggunakan spektrofotometri Uv-vis.

3. Variabel Terkontrol

Variabel yang dikendalikan pada penelitian ini adalah lama ekstraksi, suhu dan lama pengadukan pada proses ekstraksi secara maserasi.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu pisau, gunting, talenan, baskom plastik, blender, kertas saring, loyang lebar, kain hitam, batang pengaduk, labu takar, aluminium foil, pipet tetes, api bunsen, penjepit tabung reaksi, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, *matglass*, *beaker glass*, neraca analitik, tanur, oven, *waterbath*, *mechanical*

shaker, cawan porselen, kaca arloji, ayakan no 40 mesh, *rotary evaporator*, kuvet, spektrofotometer UV-Vis.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.), aquadest, alkohol 96%, metanol, etil asetat, n-Heksana, FeCl₃, serbuk Mg, HCl Pekat, asam galat, kuersetin, reagen *Folin-Ciocalteau*, larutan Na₂CO₃, larutan AlCl₃, larutan Natrium Asetat.

G. Prosedur Penelitian

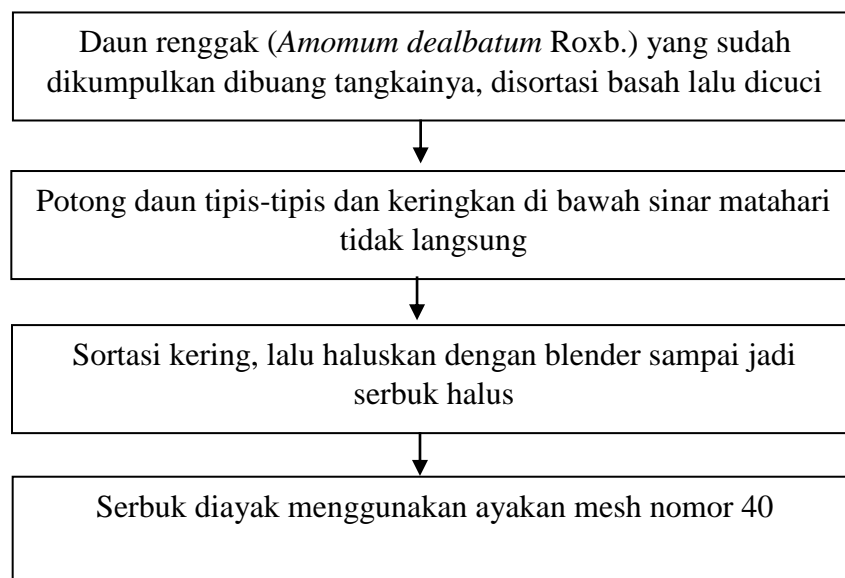
1. Determinasi Tanaman

Tahapan pertama sebelum penelitian dilakukan yaitu penyiapan tanaman yang akan digunakan sebagai sampel diantaranya daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.) yang diperoleh dari Desa Mekar Sari, Kecamatan Gunung Sari, Kabupaten Lombok Barat, NTB. Daun renggak yang telah dikumpulkan kemudian dilakukan determinasi tanaman di Labotatorium Biologi Lanjut Ruang Ekologi dan Biosistemika, Fakultas MIPA, Universitas Mataram guna memastikan kebenaran dari sampel.

2. Pembuatan Simplisia

Daun renggak yang telah dikumpulkan disortasi basah terlebih dahulu kemudian dicuci dengan air mengalir dan dilakukan perajangan tipis-tipis, setelah itu dikeringkan beberapa hari dengan sinar matahari tidak langsung, setelah didapatkan daun yang kering, selanjutnya disortasi kering dan dilakukan proses penggilingan menggunakan blender sampai menjadi serbuk yang selanjutnya diayak menggunakan ayakan nomor 40

mesh hingga diperoleh serbuk simplisia. Skema kerja pembuatan simplisia dapat dilihat pada gambar 3.1 berikut ini :



Gambar 3.1. Skema Pembuatan Simplisia Daun Renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.)

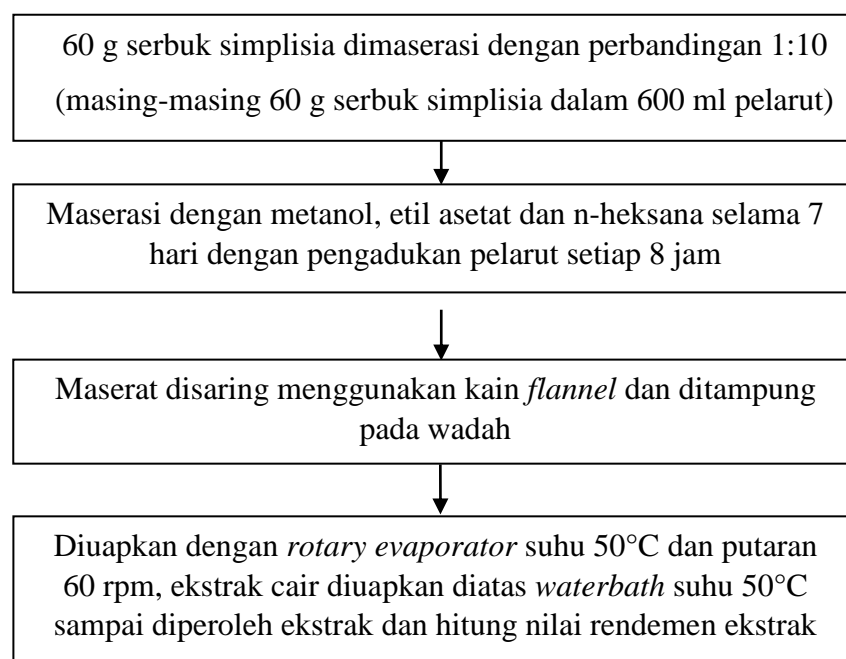
3. Pembuatan Ekstrak Daun Renggak

Pembuatan ekstrak daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.) dilakukan dengan cara metode maserasi dengan perbandingan antara serbuk simplisia dan pelarut yaitu 1:10 (Sari et al., 2021). Maserasi dilakukan dengan cara menimbang serbuk simplisia daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.) masing-masing sebanyak 60 g untuk kemudian dilarutkan dalam 3 macam pelarut yang berbeda yaitu metanol, etil asetat, dan n-heksana sebanyak 600 ml di dalam bejana maserasi pada suhu ruangan selama 7 hari dalam ruangan yang terlindung dari cahaya matahari dengan pengadukan konstan setiap 8 jam sekali. Setelah itu, dilakukan penyaringan menggunakan kain *flannel* kemudian maserat

ditampung pada wadah. Maserat yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* suhu 50°C dan putaran 60 rpm untuk memisahkan ekstrak dengan pelarut. Diuapkan diatas *waterbath* suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kering (serbuk). Ekstrak yang diperoleh dihitung nilai rendemen dan dilakukan standarisasi ekstrak yaitu uji kadar air dan abu. Rumus perhitungan rendemen dapat dilihat pada persamaan berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

Skema kerja pembuatan ekstrak pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.2 berikut ini :



Gambar 3.2. Skema Kerja Pembuatan Ekstrak Daun Renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.)

H. Standarisasi Ekstrak

1. Uji Kadar Air

Masukkan masing-masing 1 gram ekstrak daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb) yang telah diekstraksi menggunakan 3 macam pelarut yaitu metanol, etil asetat dan n-heksan pada sebuah wadah tertutup yang sudah diketahui bobotnya. Masukkan ketiga sampel tersebut ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang (Pambudi et al., 2021). Lakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk mendapatkan hasil yang valid dan hitung kadar air menggunakan perhitungan berikut :

$$\text{Kadar Air} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100 \%$$

Keterangan :

W = bobot ekstrak sebelum dikeringkan (g)

W1 = bobot wadah kosong + ekstrak (g)

W2 = bobot wadah kosong + ekstrak setelah dikeringkan (g)

2. Uji Kadar Abu

Timbang masing-masing 1 gram ekstrak daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb) yang telah diekstraksi menggunakan 3 macam pelarut yaitu metanol, etil asetat, dan n-heksan dan tempatkan ketiga sampel ke dalam cawan porcelain yang telah diketahui bobotnya (Sandri & Hadi, 2017). Ekstrak dimasukkan ke dalam tanur listrik pada suhu 750°C selama 3 jam dan ditimbang lalu hitung kadar abu dari ekstrak menggunakan perhitungan berikut :

$$\text{Kadar Abu} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100 \%$$

Keterangan :

W = bobot ekstrak sebelum diabukan (g)

W1 = bobot wadah kosong + ekstrak (g)

W2 = bobot wadah kosong + ekstrak setelah diabukan (g)

I. Uji Kualitatif

1. Skrining Fitokimia Senyawa Fenolik

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 2 mL ekstrak daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.) yang telah diekstraksi dengan pelarut metanol, etil asetat dan n-Heksana kemudian dipanaskan kurang lebih 5 menit. Setelah dipanaskan masing-masing ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Jika masing-masing larutan terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman maka positif mengandung tanin (Ergina & Pursitasari, 2014).

2. Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 2 mL ekstrak daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.) yang telah diekstraksi dengan pelarut metanol, etil asetat dan n-Heksana kemudian dipanaskan kurang lebih 5 menit. Setelah dipanaskan masing-masing ditambahkan dengan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. Jika masing-masing larutan terbentuk warna kuning hingga sampai merah, maka positif mengandung flavonoid (Ergina & Pursitasari, 2014).

J. Uji Kuantitatif

1. Penetapan Kadar Fenolik Total

a. Pembuatan Larutan Induk Asam Galat

Pembuatan larutan asam galat konsentrasi 100 ppm dilakukan dengan melarutkan 0,005 g asam galat dengan etanol hingga 50 ml.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebanyak 0,25 mL asam galat konsentrasi 100 ppm, ditambahkan 1,25 mL *Folin-Ciocalteu*, kemudian digojog dan didiamkan selama 3 menit. Ditambahkan 1 mL larutan Na_2CO_3 7,5%, lalu digojog hingga homogen dan larutan didiamkan pada suhu kamar pada *operating time* (OT) (Andriani dan Murtisiwi, 2018). Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 400 – 800 nm.

c. Penentuan *Operating Time* (OT)

Sebanyak 0,25 mL larutan asam galat konsentrasi 40 ppm, ditambahkan 1,25 mL *Folin Ciocalteu*, kemudian digojog dan didiamkan selama 3 menit. Ditambahkan 1 mL larutan Na_2CO_3 7,5%, lalu larutan digojog hingga homogen. Absorbansi diukur dalam rentang waktu 0-60 menit pada panjang gelombang 772 nm.

d. Penentuan Kurva Kalibrasi Asam Galat

Larutan standar asam galat dibuat dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm. Sebanyak 0,25 mL masing-masing larutan diambil kemudian ditambahkan 1,25 mL *Folin-Ciocalteu*, dikocok dan dibiarkan selama 3 menit. Larutan ditambahkan Na_2CO_3 sebanyak 1

mL lalu dikocok hingga homogen kemudian diinkubasi selama *operating time* (OT) pada suhu ruangan. Larutan blanko dibuat dengan cara yang sama namun sampel diganti dengan etanol pa. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum asam galat dan dibuat kurva kalibrasi asam galat (Nurung, 2016).

e. Penetapan Kadar Fenolik Total

Masing-masing Sebanyak 0,25 mL dari larutan ekstrak daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.) konsentrasi 10 ppm ditambahkan 1,25 mL *Folin-Ciocalteu*, dikocok dan didiamkan selama 3 menit. Larutan ditambahkan Na_2CO_3 sebanyak 1 mL, dikocok hingga homogen dan didiamkan pada *operating time* (OT) dalam suhu kamar. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum dalam 3 kali pengulangan. Perhitungan kadar fenolik total dilakukan dengan rumus (Nurung, 2016) :

$$\text{TPC} = \frac{\text{C. V. fp}}{\text{g}}$$

Keterangan:

TPC = *Total Phenolic Content*

C = konsentrasi fenolik (nilai x)

V = volume ekstrak yang digunakan (mL)

Fp = faktor pengenceran

g = berat sampel yang digunakan (gram)

2. Penetapan Kadar Flavonoid Total

a. Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

Larutan induk kuersetin dengan konsentrasi 2000 ppm dibuat dengan melarutkan 0,01 g kuersetin dengan etanol pa hingga 5 mL.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan menggunakan kuersetin pada panjang gelombang 300-500 nm. Sebanyak 0,5 mL larutan kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm diambil lalu direaksikan dengan 0,1 mL AlCl_3 10% dalam tabung reaksi. Ditambahkan larutan 0,1 mL natrium asetat 1M, absorbansi larutan dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 300-500 nm.

c. Penentuan *Operating Time* (OT)

Larutan kuersetin sebanyak 0,5 mL, lalu direaksikan dengan 0,1 mL AlCl_3 10%. Ditambahkan larutan 0,1 mL natrium asetat 1M serta 2,8 mL aquadest dan absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 431 nm dengan interval waktu 1 jam sampai memperoleh absorbansi yang stabil (Sari et al., 2020)).

d. Penentuan Kurva Kalibrasi Kuersetin

Penentuan kurva kalibrasi kuersetin dilakukan menggunakan seri konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm yang dibuat dari larutan induk konsentrasi 100 ppm. Tiap larutan diambil sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL natrium asetat 1M, dan aquadest sebanyak 2,8 mL lalu larutan diinkubasi selama *operating*

time (OT). Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 431 nm.

e. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Ekstrak metanol, etil asetat dan n-heksana daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.) dibuat dengan konsentrasi 10 ppm. Masing-masing larutan ekstrak diambil sebanyak 0,5 mL lalu ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL natrium asetat 1M, dan 2,8 mL aquadest. Campuran dikocok hingga homogen lalu sampel diinkubasi selama *operating time* (OT) pada suhu ruangan. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Chang, dkk., 2002). Perhitungan kadar fenolik total dilakukan dengan rumus (Sagala & Juniasti, 2021) :

$$\text{TFC} = \frac{\text{C. V. fp}}{\text{g}}$$

Keterangan:

TFC = *Total Flavonoid Content*

C = konsentrasi flavonoid dihitung dari persamaan kurva standar (nilai x) (mg/g)

fp = nilai pengenceran

V = volume hasil ekstraksi (mL)

g = berat sampel yang digunakan (gram)

K. Analisis Data

Data hasil pengukuran absorbansi yang diperoleh diolah dengan metode kurva standar dengan persamaan regresi linier $y = bx + a$ dibuat berdasarkan absorbansi dan konsentrasi larutan standar. Kadar total senyawa (nilai x) diperoleh dengan mensubstitusikan nilai absorbansi (nilai y) pada persamaan regresi linier dimana hasil dinyatakan dalam satuan ekuivalen. Selanjutnya kadar fenolik dan flavonoid ekstrak metanol, etil asetat dan n-heksana daun renggak (*Amomum dealbatum* Roxb.) yang didapatkan dianalisa secara statistika dengan analisis variansi dua arah menggunakan uji *Tukey Post Hoc* sebagai uji lanjutan dengan selang kepercayaan 95% .