

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah model rancangan eksperimental. Penelitian eksperimental adalah pengujian yang dilakukan untuk mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang disebabkan oleh suatu faktor atau perlakuan. Dalam hal ini yaitu untuk membandingkan kadar fenolik total dalam ekstrak jahe merah berdasarkan perbedaan metode pengeringan simplisia yang digunakan. Cara ekstraksi yang digunakan adalah maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, dan penentuan kadar fenolik total menggunakan metode Folin-Ciocalteu.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a) Determinasi tanaman dilakukan di Universitas Diponegoro Semarang tepatnya di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika.
- b) Pembuatan simplisia dilakukan di tempat tinggal dan Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- c) Pembuatan ekstrak dan uji standarisasi simplisia dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Kimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- d) Uji kuantitatif fenolik total dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu Penelitian

Proses penelitian dilaksanakan pada periode Desember 2022 hingga Februari 2023

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah adalah jahe merah (*Zingiber officinale* Var. *rubrum*) yang dipanen dari Kecamatan Bancak, Kabupaten Semarang.

2. Sampel

Sampel jahe merah yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 10 kg.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini yaitu:

1. Simplisia Jahe Merah

Simplisia jahe merah adalah simplisia yang diperoleh dari rimpang jahe merah asal Kecamatan Bancak yang diproses melalui 4 metode pengeringan, pengeringan dengan matahari langsung, matahari tidak langsung, kering angin, dan oven.

2. Ekstrak Jahe Merah

Ekstrak jahe merah adalah ekstrak yang diperoleh dari simplisia jahe merah melalui proses ekstraksi dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 3x24 jam pada suhu ruang (25°C) yang kemudian dilanjutkan dengan remaserasi selama 2x24 jam, lalu di evaporasi hingga didapatkan ekstrak kental.

3. Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik adalah golongan senyawa aktif utama jahe merah, senyawa fenolik yang terkandung dalam jahe merah adalah gingerol, zingeron, dan shogaol.

4. Uji Kuantitatif Senyawa Fenolik

Uji kuantitatif senyawa fenolik adalah uji yang dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu menggunakan spektrofotometri Uv-Vis dengan tujuan mendapatkan hasil kadar fenolik total pada ekstrak jahe merah.

E. Variabel Penelitian

Variabel penelitian merupakan suatu sifat yang akan diukur atau diamati dari suatu nilai yang berbeda (*different values*), dengan tujuan untuk memperoleh informasi yang akan ditarik kesimpulan (Surahman *et al.*, 2016).

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah metode pengeringan yang digunakan dalam proses pengujian, dimana penulis menggunakan 4 (empat) perlakuan dalam metode pengeringan yakni pengeringan dengan matahari langsung, matahari tidak langsung, kering angin, serta menggunakan oven.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar fenolik total dari ekstrak jahe merah.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah waktu/durasi ekstraksi serta pelarut dan volume pelarut dalam proses ekstraksi, suhu proses ekstraksi, tempat tumbuh tanaman jahe, dan usia tanaman.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a) Alat

Alat yang dibutuhkan pada penelitian ini diantaranya toples kaca, blender, cawan porselin, ayakan mesh 40, *rotary evaporator*, oven, kain flanel, loyang, penangas air, aluminium foil, spektrofotometer UV-Vis, kuvet, gelas beker, gelas ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, labu ukur, pipet volume, pipet mikro, pipet tetes, neraca analitik, oven, *Muffle Furnace*, dan *Moisture Analyzer*.

b) Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah rimpang segar jahe merah, etanol 96%, aquadest, *water for injection*, H₂SO₄ pekat, K₂Cr₂O₇, FeCl₃ reagen Folin-Ciocalteu, Asam Galat, dan natrium karbonat (Na₂CO₃) 7,5%.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. *rubrum*) dilakukan di Universitas Diponegoro Semarang tepatnya di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika.

3. Pemanenan Jahe Merah

Pemanenan rimpang jahe merah dilakukan di Kecamatan Bancak dan proses pemanenan dilakukan pada pagi hari, kriteria sampel rimpang jahe merah yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

a) Kriteria Inklusi

Sampel yang digunakan sebagai objek penelitian adalah rimpang jahe merah yang dihasilkan dari hasil panen petani yang berada di daerah Kecamatan Bancak Jawa Tengah. Untuk memaksimalkan kandungan metabolit didalam rimpang maka kriteria lain yang harus dipenuhi adalah usia penanaman rimpang yang berkisar antara 9-10 bulan.

b) Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dalam pemilihan sampel adalah rimpang jahe yang busuk dan berjamur.

4. Pembuatan Simplisia Jahe Merah

Rimpang yang digunakan merupakan rimpang yang telah berusia 9-10 bulan penanaman. Setelah rimpang dikumpulkan kemudian dicuci dengan air mengalir lalu dilakukan sortasi basah dan ditiriskan.

Rimpang jahe yang sudah melalui proses pencucian dan sortasi basah dirajang tipis kurang lebih 3-5 mm untuk memudahkan proses pengeringan berikutnya. Terdapat empat metode pengeringan yang akan dilakukan dalam penelitian ini, yaitu:

a) Matahari Langsung

Rimpang jahe merah yang sudah dirajang disusun dengan rapi pada wadah dengan bahan kayu atau rotan, rimpang jahe tidak boleh diletakkan bertumpuk satu sama lain. Rimpang jahe yang sudah disusun kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari.

b) Matahari Tidak Langsung

Rimpang jahe merah yang sudah dirajang disusun dengan rapi pada wadah dengan bahan kayu atau rotan, rimpang jahe tidak boleh diletakkan bertumpuk satu sama lain. Rimpang jahe yang sudah disusun kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutup menggunakan kain hitam.

c) Kering Angin

Rimpang jahe merah yang sudah dirajang disusun dengan rapi pada wadah dengan bahan kayu atau rotan, rimpang jahe tidak boleh diletakkan bertumpuk satu sama lain. Rimpang jahe yang sudah disusun kemudian dikeringkan di tempat yang terlindung dari sinar matahari.

d) Oven

Rimpang jahe merah yang sudah dirajang disusun dengan rapi pada loyang, rimpang jahe tidak boleh diletakkan bertumpuk satu sama lain. Rimpang jahe yang sudah disusun kemudian dikeringkan di dalam oven dengan suhu 50°C.

Simplisia yang sudah melalui proses pengeringan dilakukan sortasi kering untuk memisahkan kotoran dengan sampel. Proses berikutnya yaitu

penghalusan sampel dengan blender. Setelah sampel halus, kemudian disaring atau diayak dengan ayakan mesh no 40. hasil ayakan kemudian ditimbang.

5. Standarisasi Simplisia Parameter Non Spesifik

a) Uji Kadar Air Simplisia

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara meletakkan dua gram serbuk simplisia jahe merah ke dalam wadah yang sudah ditimbang. Serbuk simplisia jahe merah kemudian dipanaskan dalam oven dengan suhu $\pm 105^{\circ}\text{C}$ selama 3 jam. Setelah dipanaskan wadah kemudian ditimbang hingga mencapai berat konstan (Srikandi *et al.*, 2020), kadar air dikatakan memenuhi syarat apabila tidak lebih dari 11% (Farmakope Herbal Indonesia, 2017)

b) Uji Kadar Abu Simplisia

Kadar abu ditetapkan dengan metode gravimetri dengan meletakkan serbuk simplisia ke dalam cawan porselen yang sudah diketahui bobotnya, kemudian di abukan dalam *Muffle Furnace* dengan suhu maksimal 600°C selama 3 jam hingga pengabuan sempurna. Abu serbuk simplisia kemudian di dinginkan lalu di timbang dan dihitung kadar abu.

Perhitungan:

$$\text{Kadar abu} = \frac{W1 - W2}{W} \times 100\%$$

Keterangan:

W = bobot sampel sebelum diabukan (g)

W1 = bobot sampel + cawan sesudah diabukan (g)

W2 = bobot cawan kosong (g)

6. Uji Kualitatif Senyawa Fenolik Pada Simplisia dan Ekstrak

Uji kualitatif senyawa fenolik dilakukan dengan melarutkan 1 gram serbuk simplisia dan ekstrak jahe merah dengan 2 ml etanol 96%. Kemudian larutan yang dihasilkan diambil sebanyak 1 ml lalu ditambahkan dengan 2 tetes larutan FeCl_3 1%. Munculnya warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat menunjukkan adanya senyawa fenolik dalam sampel (Tahir, 2017).

7. Pembuatan Ekstrak Jahe Merah

Setiap variasi metode pengeringan serbuk simplisia jahe merah dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan serbuk simplisia dan pelarut 1:5, 300 gram serbuk simplisia dimasukkan kedalam bejana maserasi kemudian direndam dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 liter. Proses maserasi selama 3×24 jam dengan pengadukan setiap 8 jam sekali (Tahir, 2017). Kemudian setelah 3 hari ekstrak disaring dengan menggunakan kain flannel, residu diremaserasi kembali dengan perbandingan 1:3 selama 2×24 jam, lalu filtrat disaring menggunakan kain flannel.

Hasil filtrat yang didapat masih bercampur dengan pelarut sehingga harus dilakukan penguapan menggunakan rotary evaporator dalam suhu 50°C , dan untuk mendapatkan ekstrak yang benar-benar kental maka perlu

penguapan lebih lanjut menggunakan waterbath hingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak kemudian ditimbang dan dihitung rendemennya.

8. Uji Kadar Air Ekstrak

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara meletakkan dua gram ekstrak jahe merah ke dalam wadah yang sudah ditimbang. Ekstrak jahe merah kemudian dipanaskan dalam oven dengan suhu $\pm 105^{\circ}\text{C}$ selama 3 jam. Setelah dipanaskan wadah kemudian ditimbang hingga mencapai berat konstan (Srikandi *et al.*, 2020), kadar air dikatakan memenuhi syarat apabila tidak lebih dari 11% (Farmakope Herbal Indonesia, 2017).

9. Uji Bebas Etanol Ekstrak

Ekstrak yang sudah mengental diambil dan ditambahkan dengan 1 ml kalium Dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), kemudian ditambahkan dengan 3 tetes asam sulfat pekat (H_2SO_4). Perubahan warna diamati, jika hasil uji menunjukkan warna coklat maka ekstrak tidak mengandung senyawa etanol (Astutik *et al.*, 2021).

10. Uji Kuantitatif Fenolik Total Ekstrak (Alfian dan Susanti,)

a) Pembuatan Larutan Induk Asam Galat

Pembuatan larutan induk stock asam galat 500 ppm dibuat dengan menimbang 12,5 mg asam galat, di larutkan dalam 0,5 ml etanol p.a kemudian diencerkan dengan aquadest hingga batas volume 25 ml. kemudian dibuat larutan seri dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm.

b) Pembuatan Larutan Na_2CO_3 7,5%

Sebanyak 7,5 g Na_2CO_3 ditimbang dan ditambahkan aquadest sebanyak 80 ml, kemudian dididihkan hingga serbuk Na_2CO_3 larut dengan sempurna. Setelah itu dibiarkan selama 24 jam, lalu disaring dan diencerkan dengan aquadest hingga volume 100 ml.

c) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ maks)

Diambil larutan seri asam galat 100 ppm sebanyak 0,3 ml, tambahkan dengan 1,5 ml reagen Folin-Ciocalteu (1:10), kemudian digojog dan didiamkan selama 3 menit. selanjutnya ditambahkan dengan Na_2CO_3 7,5% sebanyak 1,2 ml, kemudian baca absorbansi larutan pada panjang gelombang 500-900 nm.

d) Penentuan Operating Time

Diambil larutan seri asam galat 100 ppm sebanyak 0,3 ml, tambahkan dengan 1,5 ml reagen Folin-Ciocalteu (1:10), kemudian digojog dan didiamkan selama 3 menit. selanjutnya ditambahkan dengan Na_2CO_3 7,5% sebanyak 1,2 ml, diukur absorbansi larutan dalam rentang waktu 0-60 menit pada panjang gelombang maksimum.

e) Pengukuran Larutan Standar Kurva Baku Asam Galat

Diambil sebanyak 0,3 ml larutan seri asam galat dari masing-masing konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm kemudian dimasukkan dalam tabung, lalu ditambahkan 1,5 ml reagen Folin-Ciocalteu (1:10) digojog dan dibiarkan selama 3 menit, ditambahkan larutan Na_2CO_3 7,5% sebanyak 1,2 ml lalu gojog hingga homogen. Diamkan pada range operating time pada suhu ruangan, lalu diukur absorbansi pada panjang

gelombang maksimum, dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (ppm) dengan absorbansi.

f) Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Jahe Merah

Ekstrak dalam penelitian ini adalah ekstrak matahari langsung (EML), ekstrak matahari tidak langsung (EMT), ekstrak kering angin (EKA), dan ekstrak oven (EO). Larutan induk 1000 ppm dibuat dengan cara menimbang 10 mg masing-masing ekstrak jahe merah kemudian dilarutkan dengan etanol p.a : aquadest (1:1) hingga volume 10 ml

g) Uji Kuantitatif Fenolik Total pada Ekstrak Jahe Merah

Diambil 0,3 ml larutan induk ekstrak jahe merah 1000 ppm pada masing-masing metode pengeringan, kemudian ditambahkan dengan reagen Folin-Ciocalteu (1:10) sebanyak 1,5 ml. Digojog dan dibiarkan selama 3 menit kemudian ditambahkan 1,2 ml larutan Na_2CO_3 7,5%, kocok hingga homogen lalu diamkan pada range operating time pada suhu ruang. Diukur absorbansi larutan ekstrak serapan panjang gelombang absorbansi maksimum dengan 3x replikasi hingga kadar fenol diperoleh, lalu dihitung menggunakan persamaan regresi linier baku asam galat dan hasilnya dinyatakan sebagai massa ekuivalen asam galat per g ekstrak (mg GAE/g).

Dihitung kadar fenol total sebagai berikut:

$$X = \frac{y - a}{b}$$
$$\% \text{ Kadar fenol total (EAG)} = \frac{x}{x_s} \times f \times 100\%$$

Keterangan:

y = absorbansi

x = konsentrasi

x_s = konsentrasi sampel

f = faktor pengenceran

G. Analisis Data

Untuk menentukan kadar fenolik total ekstrak jahe merah, dihitung persamaan kurva baku dari hasil pengujian data seri konsentrasi yang dibuat dari hasil baku pembandingan asam galat. Dengan rumus persamaan kurva baku $y = bx + a$, dimana y = absorbansi dalam nm, x = konsentrasi dalam ppm (mg/L). Absorbansi ekstrak jahe merah yang dihasilkan kemudian dimasukkan kedalam persamaan kurva baku sehingga diperoleh kadar fenolik total ekstrak jahe merah yang akan disajikan dalam bentuk tabel maupun bentuk lainnya. Data yang sudah diperoleh kemudian dianalisis untuk mengetahui signifikansi pengaruh metode pengeringan terhadap kadar fenolik total ekstrak jahe merah menggunakan *SPSS* dengan uji *ANOVA* dan uji *Post Hoc*.