

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan observasional analitik dengan maksud untuk melihat pengaruh perbedaan pelarut pada kandungan senyawa kurkumin. Penelitian ini dimulai dengan mengumpulkan rimpang *Curcuma caesia*, determinasi tanaman, membuat ekstrak *Curcuma caesia* menggunakan variasi pelarut, identifikasi senyawa kurkumin, serta penetapan kandungan kurkumin menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Achmad Yani Yogyakarta

2. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei hingga Juni 2023

C. Populasi/Sampel/Objek Penelitian

1. Populasi

Populasi ialah kawasan generalisasi dari objek atau subjek dengan taraf dan karakteristik khusus yang ditentukan oleh peneliti agar dapat ditelaah dan diambil kesimpulan (Sugiyono, 2018). Populasi pada penelitian ini menggunakan rimpang dari *Curcuma caesia Roxb.* yang didapatkan di Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

2. Sampel

Sampel ialah bagian dari sifat yang dipunyai oleh populasi yang dipakai untuk penelitian (Wiratna, 2015). Sampel dalam penelitian ini memanfaatkan rimpang *Curcuma caesia Roxb.* yang telah berumur 8-12 bulan sebanyak 2 kg, dengan teknik area sampling (*cluster sampling*)

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Variasi pelarut etanol, aseton, dan kloroform pada ekstraksi *Curcuma caesia*. Roxb.
2. Variabel terikat : Kandungan total kurkumin yang terdapat pada *Curcuma caesia*. Roxb
3. Variabel terkontrol : Lamanya waktu ekstraksi, lamanya waktu remaserasi, pengayakan 40 mesh, serta suhu pengeringan pada 45°C.

E. Definisi Operasional Variabel

1. *Curcuma caesia* adalah sampel yang akan diteliti untuk menentukan kadar senyawa kurkuminya. *Curcuma caesia* yang diperoleh di Sinduadi, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta diperoleh dengan cara dipanen *Curcuma caesia* yang sudah berumur 8-12 bulan.
2. Pelarut ekstraksi yang dimanfaatkan pada penelitian ini adalah etanol, aseton, dan kloroform.
3. Lama waktu ekstraksi, lama waktu remaserasi, suhu pengeringan, pengayakan yang digunakan dalam penelitian ini secara berturut turut adalah 2 x 24 jam, 24 jam, 45°C, dan pengayak 40 mesh
4. Kandungan total kurkumin adalah kadar kurkumin yang terdapat dalam sampel. Kadar kurkumin dapat dihitung menggunakan nilai absorbansi pada sampel yang sudah ditetapkan kurva linearitasnya dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang dipergunakan pada penelitian ini ialah *glassware* (*Iwaki*), timbangan analitik (*Ohaus*), oven (*Memmert*), *grinder*, pipet volume (*Iwaki*), cawan petri (*Anubra*), bejana, mikropipet (*Eppendorf & Ohaus*), cawan porselen (Lokal), ayakan 40 mesh, spektrofotometer UV-Vis (*Genesys*), pipa kapiler, dan corong *buchner*.

2. Bahan

Bahan yang dipergunakan pada penelitian ini yaitu *Curcuma caesia* dengan umur rimpang yang 8-12 bulan, metanol teknis, aseton teknis, kloroform p.a, etanol p.a, standar kurkumin (*Sigma*), plat silika gel G₆₀ F₂₅₄, dan kertas saring *whatman* no 1.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan

a. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan *Curcuma caesia* dilaksanakan di laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

b. Persiapan sampel

Dibersihkan rimpang *Curcuma caesia* kemudian diiris, diangin-anginkan dan dikeringkan di oven pada suhu 45°C. Pengeringan yang telah selesai ditandai oleh rimpang yang dengan mudah dipatahkan sewaktu diremas. Rimpang kunyit yang sudah kering, dihaluskan dengan menggunakan blender, diayak dengan ayakan 40 mesh, selanjutnya dilakukan ekstraksi.

2. Pelaksanaan

a. Pembuatan ekstrak *Curcuma caesia*

Ditimbang masing-masing sebanyak 50 g bubuk *Curcuma caesia*, larutkan dengan pelarut aseton dan kloroform. kemudian ditimbang 250 g bubuk *Curcuma caesia*, larutkan dengan pelarut metanol. Masing masing serbuk dilarutkan dengan perbandingan 1:5, di aduk serbuk *Curcuma caesia* dalam pelarut selama 5 menit, lalu dimaserasi dengan waktu 2 x 24 jam. Setelah itu dilakukan penyaringan dengan kertas *whatman* no.1. Residu yang dihasilkan dilakukan remaserasi dengan perbandingan 1:2,5 pada masing-masing pelarut. Filtrat yang didapatkan disaring dan digabungkan dengan hasil maserasi. Kemudian filtrat diuapkan di atas *waterbath* dengan suhu 45°C hingga diperoleh ekstrak kental dan

dihitungan rendemennya. Perhitungan % rendemen dapat dilihat pada rumus berikut :

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak masing-masing bagian (g)}}{\text{Bobot sampel awal yang diekstrak (g)}} \times 100\%$$

b. Uji organoleptik

Sampel ekstrak *Curcuma caesia* dengan pelarut metanol, aseton dan kloroform dilakukan uji organoleptik meliputi warna, bau, rasa dan tekstur.

c. Identifikasi senyawa kurkumin dengan KLT/TLC

Plat KLT yang dipergunakan yaitu plat silika G₆₀ F₂₅₄ yang merupakan fase diam berukuran 5 x 10 cm dengan tepi bagian bawah dan atas sejarak 1 cm sebagai letak penotolan sampel, serta batas atas plat untuk melihat proses elusi. Fase gerak terlebih dahulu dilakukan optimasi hingga didapatkan hasil yang sesuai yaitu kloroform : etanol : asam asetat glasial (9,4 : 0,5 : 0,1). Sebelum digunakan, plat silika di panaskan terlebih dahulu dalam oven dengan suhu 100°C selama 30 menit, kemudian fase gerak dijenuhkan selama 1 jam sebelum dilakukan proses KLT. Ditotolkan standar kurkumin dan ekstrak *Curcuma caesia* pada plat KLT di bagian garis bawah pada batas sebanyak 3 totolan dengan pipa kapiler sejarak 1 cm pada setiap sampel lalu plat dimasukkan dalam bejana yang telah berisi fase gerak, kemudian ditutup rapat dan ditunggu hingga proses elusi selesai. Senyawa yang telah di elusi kemudian disemprot dengan menggunakan larutan H₂SO₄ 10%. Terdapatnya senyawa kurkumin ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna kuning.

d. Penetapan kadar kurkumin dengan spektrofotometer UV-Vis

1) Pembuatan larutan induk baku kurkumin

Serbuk kurkumin ditimbang sejumlah 100,0 mg dengan menggunakan timbangan analitik, dilarutkan dengan sedikit etanol dan dimasukkan dalam labu volume 100,0 mL kemudian di addkan dengan etanol hingga tanda batas. Sehingga didapatkan konsentrasi larutan induk baku kurkumin 1000 ppm.

2) Penentuan panjang gelombang maksimum

Sebanyak 0,03 mL baku larutan induk 1000 ppm dipipet dan dimasukkan dalam labu volume 10,0 mL, lalu addkan dengan menggunakan etanol hingga batas. Diukur serapannya pada 400-800 nm hingga didapatkan λ dengan absorbansi tertinggi yaitu 424 nm.

3) Pembuatan kurva baku

Dibuat seri konsentrasi larutan baku dari induk 1000 ppm masing-masing 1 ppm sebanyak 0,01 mL, 2 ppm sebanyak 0,02 mL, 3 ppm sebanyak 0,03 mL, 4 ppm sebanyak 0,04 mL, dan 5 ppm sebanyak 0,05 mL dimasukkan ke dalam labu volume 10,0 mL lalu diencerkan menggunakan etanol hingga batas dan dibaca absorbansinya masing masing pada λ 424 nm.

4) Penentuan kadar kurkumin

Ditimbang seksama 50 mg ekstrak simplisia rimpang *Curcuma caesia* berbagai variasi pelarut dengan timbangan analitik, ekstrak dilarutkan dengan pelarut etanol dan disaring, kemudian masukan dalam labu volume 10,0 mL dengan pelarut hingga tanda batas, kemudian dibaca absorbansinya pada λ maksimum dan dihitung kadar kurkumin dalam sampel.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Identifikasi Kandungan Kurkumin dengan KLT

Isolat yang positif mengandung kurkumin akan membentuk noda yang berwarna kuning. Kemudian noda dihitung nilai Rf nya dengan persamaan sebagai berikut.

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

2. Penetapan Kadar Kurkumin dengan Spektrofotometri

a. Penentuan Panjang gelombang maksimum dan kurva standar

Panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan dengan masing masing konsentrasi diukur absorbansinya sehingga diperoleh persamaan garis kurva linieritas sebagai berikut.

$$y = ax + b$$

Dimana y ialah nilai absorbansi sampel dan x ialah konsentrasi sampel.

b. Penentuan kadar kurkumin pada sampel

Kadar kurkumin dapat dihitung berdasarkan nilai absorbansi pada sampel yang sudah ditetapkan terhadap kurva linearitas larutan standar sebagai berikut:

$$x = \frac{(y - b)}{a}$$

Dimana x ialah konsentrasi sampel dan y adalah absorbansi sampel.

4. Analisa data dengan SPSS

Diolah data yang diperoleh dengan program komputer SPSS *for windows* versi 23 dengan metode statistik. Data diuji normalitas dan homogenitasnya terlebih dahulu. Uji normalitas dijalankan dengan menggunakan *Shapiro-wilk* untuk melihat sebaran data acak. Untuk uji homogenitas dijalankan dengan *Levene's*. Data yang memperlihatkan terdistribusi yang normal dan homogen dapat dilanjut dengan pengujian *One Way Anova* dan *Post Hoc* dengan metode *Turkey*.