

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Pengambilan dan Determinasi Sampel

Sampel *Curcuma caesia* diambil di Sinduadi, Kabupaten Sleman, Yogyakarta pada awal bulan April 2023. Sampel kemudian dilakukan determinasi di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta dengan nomor surat 0298/S.Tb/IV/2023. Hasil determinasi tanaman menunjukkan bahwa *Curcuma caesia* memiliki nama spesies *Curcuma caesia* Roxb. dengan sinonim *Curcuma kuchoor* Royle dan nama lokal Temu hitam (*Black turmeric*) yang dapat dilihat pada Lampiran 2.

2. Rendemen

Setelah melalui proses persiapan sampel maka diperoleh hasil rendemen dari perhitungan bobot ekstrak dibagi dengan bobot simplisia dikali dengan 100%. Hasil rendemen dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Perhitungan Rendemen Ekstrak *Curcuma caesia*

No	Jenis Pelarut	Berat Simplisia Awal (g)	Berat Ekstrak Sampel (g)	% Rendemen Sampel
1	Metanol	250	33,1403	13,26
2	Aseton	50	4,1616	8,32
3	Kloroform	50	1,6098	3,22

Nilai persen rendemen tersebut menunjukkan bahwa ekstrak *Curcuma caesia* dengan berbagai pelarut diantaranya metanol, aseton, dan kloroform secara berturut-turut sebesar 13,26%; 8,32%; dan 3,22%. Nilai rendemen untuk pelarut aseton dan kloroform belum memenuhi syarat rendemen yaitu lebih dari 10% (Kemenkes RI, 2017).

3. Uji organoleptik

Dari pengujian yang telah dilakukan pada sampel *Curcuma caesia* didapatkan sifat fisik dari ekstrak *Curcuma caesia* pada tabel 5.

Tabel 5. Uji Organoleptik

Pelarut	Uji	Hasil
Metanol	Warna	Ungu
	Bau	Khas
	Rasa	Pahit
	Tekstur	Kental
Aseton	Warna	Coklat
	Bau	Khas
	Rasa	Pahit
	Tekstur	Kental
Kloroform	Warna	Kuning Tua
	Bau	Khas
	Rasa	Pahit
	Tekstur	Kental

4. Analisis kualitatif ekstrak *Curcuma caesia* menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa kurkuminoid yang terkandung dalam *Curcuma caesia* dengan menggunakan pembanding kurkumin.

a. Optimasi fase gerak

Guna mengetahui pemisahan analit secara tepat maka perlu dilakukan optimasi fase gerak, beberapa fase gerak yang telah diuji menunjukkan hasil yang berbeda. Hasil optimasi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 5 dan Lampiran 4.

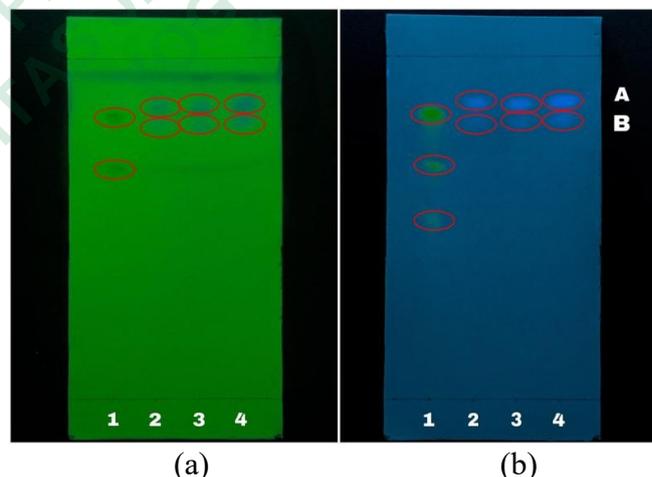
Tabel 6. Hasil Optimasi Fase Gerak Uji Kromatografi Lapis Tipis

No	Fase gerak	Hasil
1	Kloroform : Metanol (9 : 1)	Hasil elusi menunjukkan pemisahan senyawa kurkuminoid yang kurang baik dilihat dari bercak yang menghasilkan pemisahan yang tidak terlalu nampak serta bercak pada sampel tidak sejajar dengan bercak yang terdapat dalam standar.

2	Kloroform : Metanol (9,5 : 0,5)	Hasil elusi menunjukkan pemisahan senyawa kurkuminoid yang cukup baik dilihat dari bercak yang menghasilkan pemisahan senyawa yang cukup nampak. Adapun bercak pada sampel tidak terelusi secara baik dan tidak sejajar dengan bercak yang terdapat pada standar.
3	Kloroform : Etanol : Asam asetat glasial (9,4 : 0,5 : 0,1)	Hasil menunjukkan pemisahan senyawa kurkuminoid yang baik dilihat dari bercak yang menghasilkan pemisahan senyawa yang cukup nampak serta sampel memberikan bercak yang sejajar dengan standar kurkumin dan memberikan hasil elusi yang baik

b. Uji KLT pada sampel

Berdasarkan hasil optimasi maka fase gerak yang dipilih adalah Kloroform : Etanol : Asam asetat glasial dengan perbandingan 9,4 : 0,5 : 0,1. Hasil uji KLT pada ekstrak *Curcuma caesia* dapat dilihat pada Gambar 4.



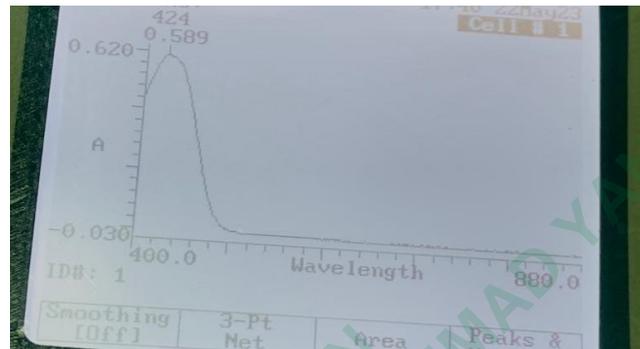
Gambar 4. Hasil KLT Sampel dengan Berbagai Variasi Pelarut Setelah Disinar UV 254 (a) dan 366 nm (b)

Keterangan: (1) Standar kurkumin, (2) Metanol, (3) Aseton, (4) Kloroform, serta (A) Kurkumin dan (B) Demetoksikurkumin/Bisdemetoksikurkumin

5. Penetapan kadar kurkumin

a. Penentuan panjang gelombang kurkumin

Proses *scanning* panjang gelombang kurkumin dengan rentang panjang gelombang 400-800 nm menghasilkan panjang gelombang maksimum sebesar 424 nm dengan nilai absorbansi 0,589. Hasil tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

b. Pembuatan kurva baku

Kurva baku diperoleh dari hasil *scanning* seri baku kurkumin yang dibuat dari larutan induk 1000 ppm dalam konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dengan panjang gelombang 424 nm. Hasil *scanning* kurva baku menghasilkan absorbansi yang dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 7. Kurva Baku Kurkumin

Konsentrasi kurkumin (ppm)	Absorbansi
1	0,364
2	0,455
3	0,661
4	0,749
5	0,828

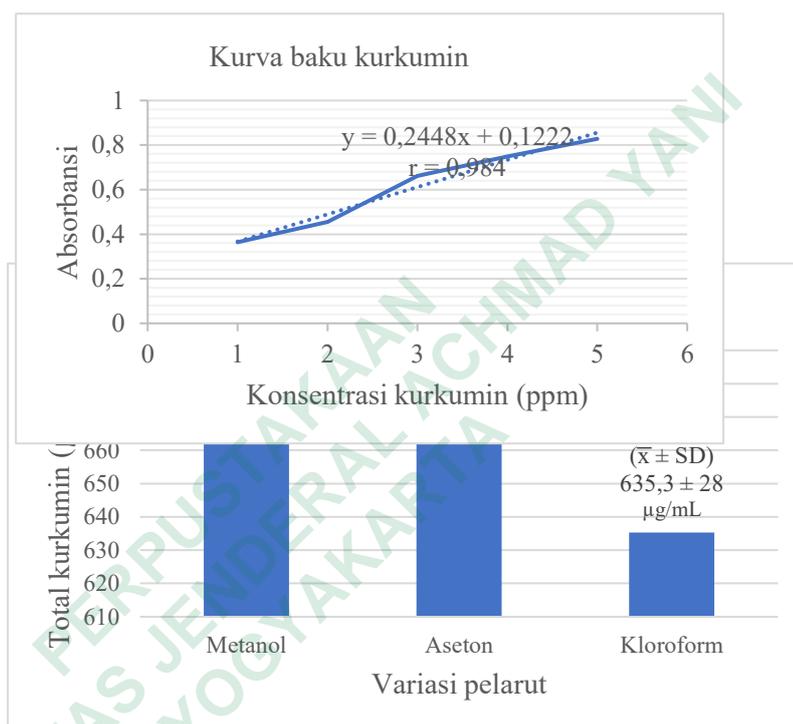
Hasil persamaan kurva baku yang diperoleh adalah $y=0,2448x+0,1222$ dengan koefisien korelasi (r) 0,984. Hal tersebut menunjukkan persamaan regresi linier memberikan hasil yang memenuhi

Gambar 6. Hasil Kurva Baku Kurkumin

syarat karena r hitung $>$ r tabel (0,878). Grafik kurva baku kurkumin dapat dilihat pada Gambar 6.

c. Penentuan kadar kurkumin ekstrak *Curcuma caesia*

Penetapan kadar kurkumin dilakukan dengan membuat



Gambar 7. Kadar Kurkumin pada Berbagai Variasi Pelarut masing-masing larutan sampel ekstrak *Curcuma caesia* konsentrasi 5000 ppm kemudian di *scanning* pada 424 nm. Dari data yang didapatkan rata-rata kadar kurkumin pada ekstrak *Curcuma caesia* dengan pelarut metanol, aseton, dan kloroform terlihat pada Gambar 7.

6. Analisis data secara SPSS

Data perhitungan kadar kurkumin yang telah diperoleh dari masing-masing sampel ekstrak *Curcuma caesia* dianalisis secara statistika menggunakan SPSS versi 29. Hasil yang diperoleh dari uji normalitas dengan menggunakan *Shapiro-wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan *Levene's* menunjukkan nilai yang terdistribusi normal dan homogen (Ho

diterima). Adapun hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan hasil tidak terdapat perbedaan dari ketiga pelarut dengan nilai F sebesar 1,510 dan nilai signifikasinya sebesar 0,294 atau $\text{sig} > 0,05$ (H_0 diterima). Pada uji *Post Hoc* diketahui pada pelarut metanol, aseton, dan kloroform memiliki nilai $\text{sig} < 0,05$ (tidak signifikan). Hasil analisis statistika dapat dilihat pada Lampiran 6.

B. Pembahasan

Curcuma caesia merupakan salah satu kelompok tanaman *zingiberaceae* yang memiliki nama latin *Curcuma caesia*. Pada hasil determinasi tanaman menunjukkan bahwa *Curcuma caesia* memiliki nama spesies *Curcuma caesia Roxb.* dengan nama sinonim *Curcuma kucloor Royle* dan nama lokal temu hitam (*Black turmeric*). Rimpang *Curcuma caesia* pada penelitian ini menggunakan metode observasional analitik untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut terbaik terhadap penarikan senyawa kurkuminoid dan *cluster sampling* sebagai teknik pengambilan sampel yang merupakan teknik pengambilan sampel dari kelompok/ klaster kemudian ditarik sampel individu dari klaster yang terpilih (Myers & Hansen, 2011). Sampel diperoleh dari Sinduadi, Kabupaten Sleman, Yogyakarta. Rimpang *Curcuma caesia* yang telah didapatkan dilakukan sortasi basah dan dikeringkan dengan suhu 45°C selama 2 hari. Pada penelitian yang telah dilakukan oleh (Ratnasari & Aini, 2023) kadar kurkumin cukup stabil pada semua suhu dan tidak terlalu sensitif oleh pemanasan di bawah titik leburnya, yaitu 183°C , sehingga pemanasan di bawah suhu tersebut masih aman dan tidak merusak struktur kurkumin. Proses pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan (Yamin *et al.*, 2017). Indikator yang dapat menandakan sampel telah siap untuk diserbuk yaitu rimpang yang mudah hancur saat diremas. Simplisia yang telah dikeringkan kemudian di haluskan dan diayak dengan menggunakan pengayak 40 mesh. Metode pengayakan dilakukan untuk memisahkan berbagai campuran partikel padat sehingga didapat ukuran partikel yang seragam serta terbebas dari kontaminan yang memiliki ukuran yang berbeda dengan menggunakan alat pengayak (Suharto, 1991). Ukuran ayakan dinyatakan dalam mesh dalam tiap in persegi, sehingga ayakan dengan mesh 40 berarti terdapat 40 lubang dalam 1 in persegi. Tahap

dilanjutkan dengan proses ekstraksi yaitu maserasi. Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia *Curcuma caesia* menggunakan pelarut metanol, aseton, dan kloroform. Pelarut ini dipilih berdasarkan sifat kepolaran masing-masing pelarut yang mempunyai indeks kepolaran berbeda sehingga akan menghasilkan kadar kurkumin yang bervariasi. Adapun indeks kepolaran untuk pelarut metanol adalah 5,1; indeks kepolaran pelarut aseton adalah 5,1; dan indeks kepolaran kloroform adalah 4,1. Metode maserasi dilakukan selama 48 jam, waktu ini merupakan waktu yang baik untuk menghasilkan rendemen ekstrak yang tinggi sebesar 8,140% (Yulianingtyas & Kusmartono, 2016) karena semakin lama waktu maserasi yang diberikan maka semakin lama kontak antara pelarut dengan bahan yang akan diperbanyak jumlah sel yang pecah dan bahan aktif yang terlarut (Wahyuni & Widjanarko, 2015). Dari hasil nilai rendemen menunjukkan variasi pelarut metanol, aseton, dan kloroform ekstrak *Curcuma caesia* secara berturut-turut sebesar 13,26; 8,32; dan 3,22%. Nilai ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak *Curcuma caesia* lebih banyak diperoleh dengan menggunakan pelarut metanol dibandingkan dengan pelarut aseton dan kloroform.

Ekstrak *Curcuma caesia* yang telah diperoleh kemudian dilakukan uji kualitatif KLT untuk mengidentifikasi adanya senyawa kurkuminoid yang terkandung dalam sampel tersebut. KLT merupakan analisis cepat yang memerlukan bahan sangat sedikit, baik standar maupun cuplikannya. KLT dapat digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang sifatnya hidrofobik seperti lipida-lipida dan hidrokarbon (Sastrohamidjojo, 2005). Optimasi fase gerak dilakukan untuk mengetahui pemisahan campuran analit secara tepat yang ditunjukkan oleh nilai Rf yang digunakan sebagai acuan adanya senyawa metabolit tersebut. Nilai Rf yang baik yaitu antara 0,2-0,8. Senyawa yang memiliki Rf lebih besar berarti mempunyai kepolaran yang rendah, begitu juga sebaliknya (Gandjar & Rohmah, 2007). Hal tersebut dikarenakan fase diam bersifat polar. Senyawa yang lebih polar akan tertahan kuat pada fase diam, sehingga menghasilkan nilai Rf yang rendah (Gandjar & Rohmah, 2007). Nilai Rf yang terlalu tinggi, maka harus mengurangi kepolaran eluen (Kemendikbud, 2018). Fase gerak yang dipilih

berdasarkan hasil optimasi yaitu kloroform : etanol : asam asetat glasial dengan perbandingan 9,4 : 0,5 : 0,1. Fase gerak tersebut dipilih karena menghasilkan bercak yang sejajar dengan standar kurkumin. Hasil yang diperoleh terdapat 3 noda pada standar dan 2 noda pada sampel. Hal tersebut dikarenakan senyawa kurkuminoid memiliki senyawa turunannya yaitu kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin. Dua noda pada sampel diperkirakan merupakan senyawa kurkumin dan demetoksikurkumin/ bisdemetoksikurkumin yang dapat diketahui dari membandingkan noda sampel dengan noda standar. Hal tersebut dapat disebabkan oleh fase gerak yang digunakan kurang bersifat polar untuk memisahkan senyawa demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin dalam matriks sampel. Selain itu berdasarkan Suharsanti *et al* (2020), senyawa yang terkandung dalam kurkuminoid paling tinggi ke rendah adalah kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin. Intensitas warna noda A lebih pekat daripada noda B sehingga dapat memberikan indikasi awal bahwa kandungan senyawa kurkumin lebih besar dibandingkan senyawa demetoksikurkumin. Sedangkan senyawa bisdemetoksikurkumin tidak terdeteksi, diduga kadarnya yang relatif kecil. Hal ini juga dapat dibuktikan melalui penelitian Cahyono *et al* (2011) bahwa rasio kandungan kurkuminoid dengan metode KCKT yang paling tinggi ke rendah secara berturut turut adalah kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin. Hal tersebut didukung oleh penelitian Jayaprakasha (2005) yang menyatakan bahwa kurkumin merupakan golongan kurkuminoid utama pada 4 jenis kunyit dan kemudian diikuti oleh demetoksikurkumin serta bisdemetoksikurkumin. Sehingga untuk dapat memisahkan kandungan senyawa utama dari senyawa yang lain dapat dilakukan fraksinasi yang merupakan teknik pemisahan kandungan kimia ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya (Asri Mulyawati & Eso, 2016). Adapun cara lain yang dapat digunakan untuk mengetahui komposisi kurkuminoid secara terperinci adalah dengan menggunakan metode KCKT atau juga dikenal dengan istilah *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Cahyono *et al.*, 2011).

Adapun untuk hasil yang telah didapatkan pada masing masing nilai Rf standar, ekstrak *Curcuma caesia* dengan pelarut metanol, aseton, dan kloroform

terhadap senyawa kurkumin secara berturut-turut yaitu 0,825; 0,85; 0,85; dan 0,862. Terdapatnya senyawa kurkuminoid ditunjukkan dengan bercak kuning yang didapatkan setelah dilakukan deteksi dengan H₂SO₄ 10% yang dapat dilihat pada Lampiran 4. H₂SO₄ 10% atau asam sulfat merupakan pereaksi yang bersifat reduktif sehingga akan memecah senyawa pada plat KLT yang dapat diamati oleh sinar tampak (Alegantina *et al.*, 2010). Selain itu senyawa kurkuminoid dalam suasana asam akan memberikan warna kuning, sedangkan dalam suasana basa akan berwarna merah bata (Kusbiantoro & Purwaningrum, 2018).

Setelah hasil uji kualitatif dinyatakan positif terdapat senyawa kurkumin, selanjutnya dilakukan uji kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis. Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode analisis yang menggunakan panjang gelombang UV dan visibel untuk mendeteksi senyawa dengan memberikan nilai absorbansi (Sahumena *et al.*, 2020). Metode ini digunakan karena senyawa kurkumin yang diujikan memiliki gugus kromofor dan ausokrom. Langkah awal dalam analisis dengan spektrofotometri UV-Vis adalah penentuan panjang gelombang maksimum. Tujuannya agar dapat mengetahui daerah serapan yang dihasilkan adalah yang optimum (Sukmawati *et al.*, 2018). Pelarut yang dipergunakan pada penentuan panjang gelombang maksimum adalah etanol. Selain sebagai pelarut etanol juga dipergunakan sebagai blangko dengan tujuan untuk mengkalibrasi alat instrumen spektrofotometer UV-Vis (Elsan & Minarsih, 2022). Hasil penentuan panjang gelombang maksimum yang didapatkan adalah 424 nm. Panjang gelombang ini belum sesuai dengan panjang gelombang kurkumin secara teoritis yaitu 425 nm (Kim *et al.*, 2013). Pergeseran panjang gelombang tersebut dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, kelembapan, pelarut, waktu pembacaan sampel dan cahaya (Misbahri *et al.*, 2014). Adapun panjang gelombang untuk senyawa demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin adalah 420 dan 416 nm (Pushpakumari *et al.*, 2014). Proses selanjutnya yaitu pembuatan kurva baku yang bertujuan untuk mencari persamaan regresi linier sehingga dapat digunakan dalam mencari suatu kadar yang absorbansinya sudah diukur. Persamaan linier didapatkan dari hubungan antara seri kadar kurkumin dengan absorbansi kurkumin. Hasil persamaan regresi linier pada seri kurva baku adalah $y = 0,2448x + 0,1222$

dengan nilai r (koefisien korelasi) sebesar 0,984. Nilai koefisien korelasi yang mendekati 1 menunjukkan terdapat hubungan antara konsentrasi kurkumin dengan nilai absorbansi (Candradireja, 2014). Pada data absorbansi yang telah dihasilkan dikatakan baik, karena menunjukkan nilai absorbansi berturut-turut dari yang terkecil sebesar 0,2-0,8. Hal tersebut sesuai dengan Hukum *Lambert Beer* yang menyatakan hubungan lurus antara absorbansi dan kadar analit (Neldawati *et al.*, 2013). Pada tahap penetapan kadar kurkumin pada sampel *Curcuma caesia* diperoleh nilai absorbansi sampel yang dapat dihitung berdasarkan persamaan garis yang telah diperoleh. Dari hasil penetapan kadar kurkumin pada sampel pelarut metanol diperoleh nilai kadar kurkumin sebesar $(\bar{x} \pm LE)$ $682 \pm 112,54 \mu\text{g/mL}$; sampel pelarut aseton diperoleh nilai sebesar $(\bar{x} \pm LE)$ $644 \pm 50,43 \mu\text{g/mL}$; serta pada sampel pelarut kloroform diperoleh nilai sebesar $(\bar{x} \pm LE)$ $635,3 \pm 71,89 \mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis pelarut dapat mempengaruhi kadar kurkumin pada sampel. Berdasarkan hasil, kadar kurkumin yang tertinggi terdapat pada pelarut metanol. Hal tersebut disebabkan pelarut dengan tingkat kepolaran medium lebih baik dibandingkan dengan pelarut non polar (Sepahpour *et al.*, 2018). Selain itu, senyawa kurkuminoid merupakan senyawa yang termasuk dalam golongan fenolik. Senyawa fenolik mempunyai kelarutan larut dalam air, metanol, aseton, dan etil asetat (Firdayani & Winarni Agustini, 2015 ; Marhardani & Yuanita, 2021). Rata-rata kadar kurkumin dari ekstrak *Curcuma caesia* dengan pelarut metanol dan aseton tidak berbeda nyata karena kedua pelarut tersebut mempunyai indeks polaritas yang sama yaitu 5,1 (Sinko. Patric J, 2011). Sehingga, kemampuan kedua pelarut tersebut dalam mengekstrak senyawa kurkumin pada *Curcuma caesia* tidak terdapat perbedaan yang nyata.

Hasil kadar kurkumin dari masing-masing pelarut ekstrak *Curcuma caesia* kemudian diuji secara statistika dengan menggunakan *One Way ANOVA* yang merupakan salah satu teknik analisis *multivariate* yang berfungsi untuk membedakan rerata lebih dari dua kelompok data dengan membandingkan variasinya (Ghozali, 2009). Kriteria pengujian hipotesis pada taraf signifikan 0,05 adalah jika $F_{\text{hitung}} < F_{\text{tabel}}$ maka H_0 diterima, sebaliknya jika $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ maka H_0 ditolak (Sugiyono, 2018).

Syarat untuk uji ini adalah nilai standarisasi residual untuk semua pengukuran (variabel) harus berdistribusi normal. Dalam uji normalitas digunakan uji *Shapiro-wilk* karena umumnya menggunakan sampel kurang dari 50 data. Sedangkan uji *Kolmogorof-Smirnof* menggunakan sampel lebih dari 50 data (A'dadiyyah, 2021). Uji homogenitas varian dilakukan untuk mengetahui apakah kedua kelompok sampel memiliki kesamaan karakteristik (homogen) atau tidak. Dalam penelitian ini, pengujian homogenitas menggunakan uji *Levene's*. Pemilihan uji *Levene's* berdasarkan pada desain penelitian yang memunculkan data dengan jumlah kelompok lebih dari dua. Kriteria pengujian yang digunakan dalam uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene's* adalah apabila nilai sig < 0,05 maka data dikatakan tidak berdistribusi normal dan tidak homogen. Sebaliknya, apabila nilai sig > 0,05 maka data dikatakan berdistribusi normal dan homogen (Putra *et al.*, 2019). Untuk menetapkan variabel yang paling berpengaruh maka dilakukan uji *Post Hoc (Turkey)* yang dilakukan dengan berpasangan pasangan (Wulandari & Santoso, 2017). Dari uji yang telah dilakukan didapatkan hasil data terdistribusi normal dan homogen karena sig > 0,05. Adapun untuk uji *One Way ANOVA* diperoleh hasil tidak terdapat perbedaan yang nyata antara ketiga pelarut dengan nilai F sebesar 1,510 dan nilai signifikansinya sebesar 0,294 atau sig > 0,05 (Ho diterima). Pada Uji *Post Hoc* diketahui pada pelarut metanol, aseton, dan kloroform memiliki nilai sig > 0,05 (tidak signifikan) maka bisa disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan kadar kurkumin pada ketiga pelarut tersebut.