

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimen.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) yang diperoleh dari Noelbaki, Kabupaten Kupang Tengah, Provinsi Nusa Tenggara Timur.

2. Sampel dan teknik sampling

a. Sampel

Sampel yang digunakan adalah rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) segar berwarna jingga yang diperoleh dari Noelbaki, Kabupaten Kupang Tengah, Provinsi Nusa Tenggara Timur.

b. Teknik sampling

Teknik sampling yang digunakan adalah purposive sampling, dengan sampel rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) segar berwarna jingga yang diperoleh dari Noelbaki, Kabupaten Kupang Tengah, Provinsi Nusa Tenggara Timur.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Kimia, dan Teknologi Sediaan Farmasi di Program studi D-III Farmasi, Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Mei 2026.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah waktu perebusan (15, 20, 25, dan 30 menit) dan suhu perebusan (80 dan 100° C) rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.).

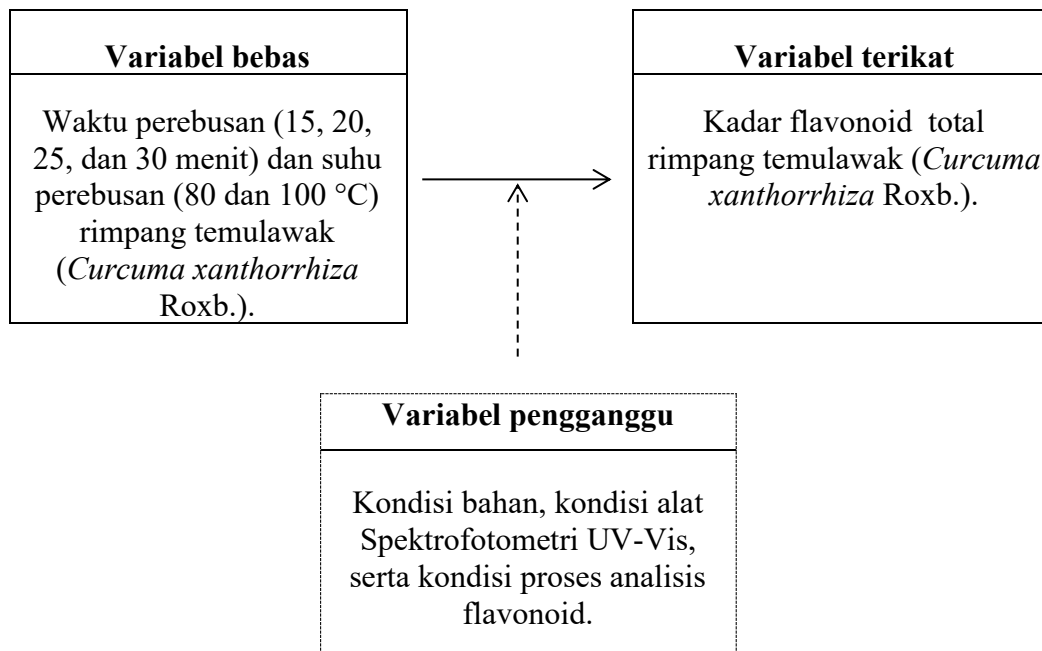
2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah kadar flavonoid total rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.).

3. Variabel pengganggu

Kondisi bahan, kondisi alat Spektrofotometer UV-Vis, serta kondisi proses analisis flavonoid.

E. Kerangka Konsep



Keterangan

———— :Yang diteliti
 ----- :Tidak diteliti

F. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala
1	Rimpang temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.)	Rimpang temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.) berdaging jingga dengan kondisi segar, dan tidak busuk.		Nominal
2	Waktu perebusan	Lamanya proses perebusan rimpang temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.) pada waktu 15, 20, 25, dan 30 menit.	Stopwatch	Rasio
3	Suhu perebusan	Tingkat panas air selama proses perebusan rimpang temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.) yang diatur pada 80 dan 100 °C	Termometer digital	Rasio
4	Kadar flavonoid total	Jumlah total senyawa flavonoid yang terkandung dalam rebusan rimpang temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.) hasil variasi waktu dan suhu perebusan, yang diukur menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis dan dinyatakan dalam mg QE/100 mL.	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio

G. Prosedur Peneliiian

1. Alat dan bahan

a. Alat

Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-2600), neraca digital, neraca analitik, termometer digital, *stopwatch*, gelas ukur (10 dan 200 mL) , labu ukur 10 mL (*IWAKI*), labu ukur 100 mL (*IWAKI*), batang pengaduk

(*pyrex*), pipet volume (0,5, 1, dan 5 mL), pipet tetes, kuvet, corong kaca, kertas saring, hot plate, pisau *stainless steel*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, penjepit tabung, kaca arloji, sendok tanduk, kertas perkamen dan wadah pencucian.

b. Bahan

Rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) segar, akuadest, etanol 70%, aluminium klorida (AlCl_3), kalium asetat (CH_3COOK), kuersetin, natrium hidroksida (NaOH) encer, asam klorida pekat, dan serbuk magnesium.

2. Pengambilan sampel

Sampel diambil secara manual, diambil bagian rimpang yang berwarna jingga dalam kondisi segar, tidak busuk, dan tidak rusak secara fisik dari tumbuhan rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) sebanyak 6 kg. Sampel diperoleh dari Noelbaki, Kabupaten Kupang Tengah, Provinsi Nusa Tenggara Timur.

3. Pengolahan rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

Rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) segar direndam dalam wadah pencucian hingga kotoran yang menempel mudah dilepaskan, kemudian dicuci menggunakan air bersih yang mengalir sambil dilakukan proses sortasi. Rimpang yang telah bersih selanjutnya diiris melintang dengan ketebalan $\pm 0,6$ cm (Fitriani *et al.*, 2023).

4. Pembuatan rebusan rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

Sebanyak 200 mL air dimasukkan ke dalam panci dan dipanaskan hingga mencapai suhu 80 atau 100° C sesuai perlakuan penelitian. Setelah suhu tercapai, rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) sebanyak 200 gram dimasukkan ke dalam air. Waktu perebusan dihitung sejak rimpang dimasukkan, dengan variasi waktu 15, 20, 25, dan 30 menit pada masing-masing suhu. Setiap kombinasi perlakuan dilakukan tiga kali ulangan secara independen. Setelah proses perebusan selesai, larutan hasil rebusan didinginkan dan disaring, kemudian dari masing-masing variasi waktu dan suhu perebusan diambil sebanyak 5 mL larutan hasil rebusan untuk dianalisis.

5. Uji kualitatif flavonoid rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

a. Pereaksi AlCl_3

Keberadaan flavonoid dalam sampel dapat diketahui melalui uji kualitatif dengan menambahkan pereaksi aluminium klorida (AlCl_3) ke dalam larutan sampel. Terbentuknya warna kuning setelah penambahan pereaksi tersebut menunjukkan bahwa sampel mengandung senyawa flavonoid (Ni'ma dan Lindawati, 2022).

b. Uji Wilstater Cyanidin

Uji kualitatif flavonoid dengan mereaksikan serbuk magnesium dan HCl pekat ke dalam sampel sehingga terbentuk warna merah hingga jingga sebagai tanda positif flavonoid (Ni'ma dan Lindawati, 2022).

c. Pereaksi NaOH encer

Sejumlah sampel diambil dan ditambahkan dengan NaOH encer sehingga terbentuk warna kuning yang menandakan hasil positif (Ni'ma dan Lindawati, 2022).

6. Penetapan kadar flavonoid total rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

a. Pembuatan pereaksi

1) Alumunium klorida 10%

Serbuk AlCl_3 ditimbang sebanyak 2,5g, kemudian diencerkan dengan aquadest hingga volume 25,0 mL menggunakan labu takar (Ni'ma dan Lindawati, 2022).

2) Kalium asetat 1 M

Serbuk CH_3COOK ditimbang sebanyak 2,4535 g, kemudian diencerkan dengan aquadest hingga volume 25,0 mL menggunakan labu takar (Ni'ma dan Lindawati, 2022).

3) Larutan blanko

Sebanyak 3 mL etanol 70% terlebih dahulu diambil menggunakan pipet, kemudian dicampurkan dengan 0,2 mL CH_3COOK 1 M dan 0,2 mL AlCl_3 10%. Campuran tersebut selanjutnya diencerkan menggunakan aquadest hingga volume akhirnya mencapai 10,0 mL pada labu takar (Ni'ma dan Lindawati, 2022).

b. Pembuatan larutan standar kuersetin

1) Larutan standar kuersetin 100 ppm

Ditimbang 10 mg kuersetin dan dimasukkan ke labu takar 100,0 mL, selanjutnya diencerkan menggunakan etanol 70% hingga mencapai tanda batas dan diperoleh baku kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm.

2) Penentuan panjang gelombang maksimal

Sebanyak 1 mL larutan baku kerja 60 ppm direaksikan dengan etanol 70%. 3 mL, larutan AlCl_3 0,2 mL, dan larutan CH_3COOK 1 M 0,2 mL, kemudian diencerkan dengan akuades hingga volume 10,0 mL. Setelah inkubasi 30 menit, absorbansi larutan diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 400–500 nm (Ni'ma dan Lindawati, 2022).

3) Pembuatan deret baku

Larutan baku induk kuersetin dipipet masing-masing sebanyak 10; 12,5; 15; 17,5; dan 20 mL kemudian diencerkan dengan etanol 70% dalam labu takar 25,0 mL sampai mencapai tanda batas untuk memperoleh konsentrasi 40, 50, 60, 70, dan 80 ppm. Setiap seri konsentrasi diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke labu ukur 10,0 mL, kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 3 mL, larutan AlCl_3 10% sebanyak 0,2 mL, serta larutan CH_3COOK 1 M sebanyak 0,2 mL. Campuran kemudian diencerkan menggunakan

aquades hingga volume 10,0 mL. Seri larutan untuk kurva kalibrasi selanjutnya di inkubasi selama 30 menit, dimulai dari konsentrasi terendah hingga tertinggi (Ni'ma dan Lindawati, 2022)

- c. Penetapan kadar flavonoid total rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

Ditimbang 200 gram rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dan direbus dalam 200 mL air pada suhu 80 dan 100° C dengan variasi waktu 15, 20, 25, dan 30 menit. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan secara independen sambil sesekali diaduk. Setelah perebusan selesai, hasil rebusan didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh dari masing-masing perlakuan waktu perebusan diambil sebanyak 5 mL. Sampel tersebut kemudian direaksikan dengan 3 mL etanol 70%, 0,2 mL AlCl_3 10%, serta 0,2 mL CH_3COOK 1 M. Setelah seluruh pereaksi tercampur, aquadest ditambahkan hingga larutan mencapai volume 10,0 mL. Selanjutnya, larutan didiamkan selama 30 menit untuk proses inkubasi. Setelah waktu inkubasi terpenuhi, nilai absorbansi sampel ditentukan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah ditetapkan (Ni'ma dan Lindawati, 2022).

H. Analisis Data

1. Penetapan kadar flavonoid

Penentuan kadar flavonoid total dilakukan berdasarkan persamaan regresi linier dari hubungan antara konsentrasi larutan standar dan absorbansi. Perhitungan kadar flavonoid selanjutnya dilakukan berdasarkan Persamaan 1:

$$y = a + bx$$

Keterangan:

y = serapan

a = konstanta

x = konsentrasi (ppm)

b = kemiringan (slope) kurva linier atau koefisien regresi

Kriteria seksama dalam analisis kadar flavonoid total dari hasil perebusan rim pang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dapat terpenuhi jika metode menghasilkan nilai koefisien variasi (KV) $\leq 2\%$. Semakin kecil nilai persentase KV yang diperoleh, maka semakin baik tingkat ketelitian data yang dihasilkan. Perhitungan persentase koefisien variasi (%KV) dilakukan berdasarkan Persamaan 2:

$$\% \text{ KV} = \frac{\text{standar deviasi}}{\text{rata - rata}} \times 100\%$$

Keterangan :

% KV = koefisien variasi

SD = standar deviasi

Rata-rata = rata-rata kadar flavonoid dalam sampel

(Ni'ma dan Lindawati, 2022).

2. Analisis perbandingan

Perbandingan kadar flavonoid pada rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dengan variasi waktu dan suhu perebusan dianalisis menggunakan *software* SPSS pada taraf signifikansi 95% ($\alpha = 0,05$), dengan kadar flavonoid sebagai variabel dependen serta suhu dan waktu perebusan sebagai variabel independen. Sebelum itu, dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas varians untuk memastikan data memenuhi asumsi parametrik.

Selanjutnya, data dianalisis menggunakan *ANOVA* dua jalan (*Two-Way ANOVA*) untuk mengetahui pengaruh masing-masing faktor dan interaksi keduanya terhadap kadar flavonoid. Jika terdapat perbedaan signifikan ($p \leq 0,05$), dilakukan uji lanjut (*post hoc*) *Bonferroni*, sedangkan jika asumsi tidak terpenuhi digunakan uji non-parametrik sebagai alternatif (Saputri *et al.*, 2022).

Hipotesis yang digunakan adalah:

H1 : nilai $sig. \leq 0,05 \rightarrow$ terdapat perbedaan signifikan

H0 : nilai $sig. > 0,05 \rightarrow$ tidak terdapat perbedaan signifikan