

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif eksperimental laboratorium dengan pendekatan analisis spektrofotometri UV–Vis.

B. Tempat Dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Bahan Alam dan Laboratorium Sediaan Prodi Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang

2. Waktu penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan April-Mei 2026

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi penelitian adalah produk minuman instan serbuk berbahan temulawak yang beredar di Kota Kupang.

2. Sampel

Sampel penelitian ditentukan menggunakan teknik *purposive sampling*, dengan kriteria produk minuman serbuk temulawak yang memiliki izin edar dan mudah diperoleh di pasaran.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (Independent Variable)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sampel minuman serbuk temulawak.

2. Variabel terikat (Dependent Variable)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah absorbansi dan kadar kurkumin

3. Variabel Terkontrol

Jenis pelarut, panjang gelombang maksimum, volume larutan, dan kondisi pengukuran.

A. Definisi Operasional Variabel

Tabel 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala
Sampel minuman serbuk temulawak	Produk minuman serbuk yang mengandung ekstrak temulawak yang dianalisis	Timbangan analitik	Nominal
Absorbansi	Nilai serapan kurkumin pada larutan pada Panjang gelombang maksimum	Spektrofotometri UV-Vis	Rasio
Kadar Kurkumin	Jumlah kurkumin dalam sampel yang dihitung dari kurva baku	Perhitungan regresi linear	Rasio
Panjang gelombang	Panjang gelombang maksimum tempat kurkumin menyerap cahaya	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio

F. Kerangka Konsep Penelitian

Variabel Bebas	Proses	Variabel Terikat
Minuman serbuk berbahan temulawak	1. Penimbangan sampel 2. Ekstraksi kurkumin 3. Pembuatan larutan uji 4. Pengukuran absorbansi dengan spektrofotometri	kadar kurkumin dalam minuman serbuk temulawak

UV-Vis		
Kurkumin standar	1. Pembuatan larutan standar	Nilai konsentrasi kurkumin (mg/g atau %)
	2. penentuan Panjang gelombang maksimum	
	3. pembuatan kurva baku	

Tabel 2 Kerangka Konsep

G. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan seperangkat alat Spektrofotometri UV-Vis, kuvet kuarsa, neraca analitik, Gelas kimia (50 mL, 100 mL, 250 mL), labu ukur (10 mL, 100 mL), Pipet volume 1 mL, pipet volume 10 mL, pipet tetes (1 mL, 2 mL, 3mL, 4 mL, 5 mL), corong dan kertas saring, alumuniumfoil, pengaduk kaca, penangas air dan botol kaca gelap dipakai di laboratorium.

2. Bahan

Bahan yang dibutuhkan baku pembanding kurkumin, sampel minuman serbuk berbahan temulawak, asam borat, asam oksalat, anhidrida asam asetat, alkohol 96%, aquadest.

H. Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini, prosedur analisis mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Rahayu et al. (2010) melalui pembentukan kompleks

rubrocurcumin menggunakan pereaksi asam borat dan asam oksalat yang diukur secara spektrofotometri UV-Vis dilakukan karena maserasi merupakan metode yang lebih sesuai untuk senyawa kurkuminoid yang bersifat termolabil sehingga dapat meminimalkan degradasi akibat pemanasan serta tetap mampu menghasilkan ekstrak yang representatif untuk analisis kuantitatif.

1. Prosedur Maserasi Sampel

- a. Timbang sampel minuman serbuk temulawak sebanyak 200 g dengan neraca analitik.
- b. Masukkan sampel ke dalam wadah maserasi (botol kaca bertutup) yang bersih dan kering.
- c. Tambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan sampel : pelarut 1:5 (b/v) hingga seluruh sampel terendam.
- d. Tutup wadah maserasi dan biarkan pada suhu ruang selama 24 jam, terlindung dari cahaya, sambil dilakukan pengadukan sesekali.
- e. Setelah waktu maserasi selesai, saring campuran menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat (maserat) dari residu.
- f. Residu dapat dimaserasi ulang satu kali dengan pelarut segar untuk meningkatkan perolehan kurkumin, kemudian seluruh filtrat digabungkan.
- g. Filtrat hasil maserasi digunakan sebagai bahan uji dan dilanjutkan ke tahap persiapan sampel.

- h. Prosedur maserasi ini dipilih karena tidak melibatkan pemanasan sehingga sesuai untuk mengekstraksi kurkumin yang bersifat termolabil. Alkohol 96% digunakan sebagai pelarut karena mampu melarutkan kurkumin secara efektif dan direkomendasikan dalam ekstraksi bahan alam (Harborne, 1998; Departemen Kesehatan RI, 2017).

2. Pembuatan Larutan Baku Kurkumin

Larutan stok kurkumin dibuat dengan menimbang baku kurkumin sebanyak 10 mg menggunakan neraca analitik. Baku kurkumin kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan menggunakan etanol 96%. Selanjutnya volume dicukupkan hingga tanda batas menggunakan etanol 96% dan larutan dihomogenkan sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan stok disimpan dalam botol kaca berwarna gelap dan terlindung dari cahaya hingga digunakan pada tahap analisis.

a. Pembuatan Larutan Standar Kurkumin

Untuk membuat larutan standar kurkumin, ditimbang 10 mg kurkumin dan dilarutkan ke dalam 100 mL etanol 96%, sehingga larutan konsentrasi larutan standar menjadi 100 ppm. Untuk membuat pengenceran konsentrasi sebanyak 10, 20, 30, 40, 50 ppm, maka dipipet larutan standar secara berurutan 1, 2, 3, 4, dan 5 mL dan dimasukan dalam labu ukur 10 mL.

b. Pembentukan Kompleks Rubrocurcumin

Pembentukan kompleks rubrocurcumin merupakan tahapan penting dalam analisis kurkumin menggunakan metode spektrofotometri UV–Vis karena bertujuan meningkatkan selektivitas dan sensitivitas pengukuran. Tahapan ini dilakukan baik pada larutan standar maupun larutan sampel, sehingga respon absorbansi yang diperoleh berasal dari kompleks kurkumin–borat yang stabil. Prosedur pembentukan kompleks rubrocurcumin dilakukan sebagai berikut:

1. Pipet sejumlah volume tertentu larutan standar kurkumin atau larutan sampel ke dalam labu ukur atau tabung reaksi yang bersih dan kering.
2. Tambahkan larutan asam borat ke dalam larutan uji, kemudian ditambahkan larutan asam oksalat untuk menciptakan suasana asam yang mendukung pembentukan kompleks.
3. Tambahkan anhidrida asam asetat secukupnya ke dalam campuran, kemudian homogenkan secara perlahan.
4. Diamkan campuran selama waktu tertentu hingga terbentuk kompleks rubrocurcumin yang ditandai dengan perubahan warna larutan dari kuning menjadi merah.
5. Setelah kompleks terbentuk sempurna dan stabil, larutan siap digunakan untuk pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV–Vis.

c. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko dibuat dengan prosedur yang sama seperti pembentukan kompleks pada larutan standar, namun tanpa penambahan baku kurkumin. Sebanyak 20 mg asam borat dan 20 mg asam oksalat dimasukkan ke dalam gelas beker, kemudian ditutup menggunakan plastik hitam dan dipanaskan di atas penangas air selama 10 menit. Setelah campuran didinginkan hingga suhu ruang, larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan anhidrida asam asetat hingga tanda batas, kemudian dihomogenkan. Larutan blanko digunakan sebagai pembanding (blanko) pada seluruh pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

d. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (490,5 nm)

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk memperoleh panjang gelombang. Larutan standar kurkumin konsentrasi 20 ppm dipipet sebanyak 1 mL ke dalam gelas beker. Selanjutnya ditambahkan 20 mg asam borat dan 20 mg asam oksalat, kemudian campuran ditutup menggunakan plastik hitam dan dipanaskan di atas penangas air selama 10 menit. Setelah dingin, campuran dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan anhidrida asam asetat hingga tanda batas dan dihomogenkan. Larutan dimasukkan ke dalam kuvet kuarsa, kemudian dilakukan pemindaian menggunakan

spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400–800 nm dengan menggunakan larutan blanko sebagai pembanding.

3. Pembuatan Kurva Baku

Larutan kerja dibuat dari larutan standar kurkumin dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm yang telah disiapkan sebelumnya. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 1 mL ke dalam gelas beker, kemudian ditambahkan 20 mg asam borat dan 20 mg asam oksalat. Campuran ditutup menggunakan plastik hitam dan dipanaskan di atas penangas air selama 10 menit. Setelah didinginkan hingga suhu ruang, campuran dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan anhidrida asam asetat hingga tanda batas. Larutan kemudian dihomogenkan hingga diperoleh larutan yang siap diukur absorbansinya.

Pembuatan Kurva Baku

Kurva baku dibuat dengan memplotkan konsentrasi larutan standar (ppm) sebagai sumbu X terhadap nilai absorbansi sebagai sumbu Y. Selanjutnya dilakukan analisis regresi linear sehingga diperoleh persamaan garis regresi:

$$y = bx + a$$

Keterangan:

y = absorbansi

x = konsentrasi kurkumin (ppm)

b = kemiringan garis (slope)

a = intersep

Nilai koefisien determinasi (R^2) digunakan untuk menilai linearitas metode. Hubungan antara konsentrasi dan absorbansi dinyatakan memenuhi linearitas apabila diperoleh hubungan yang linier sesuai dengan persyaratan validasi metode analisis.

4. Preparasi Sampel

a. Ekstraksi Sampel dengan Metode Maserasi

Preparasi sampel dilakukan dengan modifikasi terhadap metode Rahayu et al. (2010), yaitu pada tahap ekstraksi. Metode refluks yang digunakan pada penelitian tersebut diganti dengan metode maserasi menggunakan etanol 96%. Modifikasi dilakukan untuk menghindari degradasi senyawa kurkuminoid akibat pemanasan serta menyesuaikan kondisi penelitian. Sebanyak 200 g sampel minuman serbuk temulawak ditimbang menggunakan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke dalam wadah maserasi. Sampel ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan 1:5 (b/v) hingga seluruh sampel terendam. Campuran dimaserasi selama 5 hari pada suhu ruang dengan pengadukan sesekali agar proses penyarian berlangsung optimal. Setelah proses maserasi selesai, campuran disaring menggunakan kertas saring Whatman No.1 sehingga diperoleh filtrat. Residu kemudian

dimaserasi kembali menggunakan pelarut yang sama. Seluruh filtrat digabungkan dan digunakan sebagai larutan sampel.

b. Pembuatan Larutan Sampel

Filtrat hasil maserasi dihomogenkan, kemudian dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 5 mL. Selanjutnya ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas dan dihomogenkan. Larutan hasil pengenceran digunakan sebagai larutan sampel untuk penetapan kadar kurkuminoid.

c. Penetapan Kadar Kurkuminoid

Penetapan kadar kurkuminoid dilakukan melalui pembentukan kompleks rubrocurcumin menggunakan asam borat dan asam oksalat, kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sebanyak 1 mL larutan sampel hasil pengenceran dimasukkan ke dalam gelas beker. Selanjutnya ditambahkan 20 mg asam borat dan 20 mg asam oksalat. Campuran ditutup menggunakan plastik hitam, kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 10 menit. Setelah didinginkan hingga suhu ruang, larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan anhidrida asam asetat hingga tanda batas. Larutan kemudian dihomogenkan sebelum dilakukan pengukuran absorbansi.

d. Pengukuran Absorbansi

Larutan sampel dimasukkan ke dalam kuvet kuarsa yang bersih, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada

panjang gelombang maksimum. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan larutan blanko sebagai pembanding.

$$\text{Kadar} = m \ C \times V \times \text{FP}$$

Keterangan:

C = konsentrasi hasil pembacaan kurva baku (mg/L atau ppm)

V = volume larutan sampel (L)

FP = faktor pengenceran

m = berat sampel (g)

5. Uji Presisi

Uji presisi dilakukan untuk mengetahui tingkat keterulangan hasil pengukuran pada kondisi analisis yang sama.

Larutan baku kurkumin dengan konsentrasi 20 ppm diperlakukan sesuai prosedur pembentukan kompleks rubrocurcumin. Sebanyak 1 mL larutan dipipet ke dalam gelas beker, kemudian ditambahkan 20 mg asam borat dan 20 mg asam oksalat. Campuran ditutup menggunakan plastik hitam, dipanaskan pada penangas air selama 10 menit, kemudian didinginkan. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan anhidrida asam asetat hingga tanda batas, kemudian dihomogenkan. Selanjutnya absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

- a. Pengukuran dilakukan sebanyak enam kali replikasi terhadap larutan yang sama. Data absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung nilai rata-rata, simpangan baku (*Standard Deviation*), dan simpangan baku relatif (*Relative Standard Deviation* atau %RSD).

- b. Kriteria Penerimaan

Metode analisis dinyatakan memiliki presisi yang baik apabila nilai %RSD $\leq 2\%$. Nilai ini menunjukkan bahwa variasi hasil pengukuran masih berada dalam batas yang dapat diterima untuk analisis kuantitatif menggunakan spektrofotometri UV–Vis. Semakin kecil nilai %RSD yang diperoleh, maka semakin baik tingkat presisi metode analisis. Nilai %RSD yang memenuhi kriteria penerimaan menunjukkan bahwa metode spektrofotometri UV–Vis yang digunakan mampu memberikan hasil pengukuran yang konsisten dan dapat diandalkan.

Rata-rata: $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$

Simpangan baku

Persen simpangan baku relative %RSD = $\frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$

6. Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan menggunakan metode penambahan baku (*standard addition method*) untuk mengetahui tingkat kedekatan hasil pengukuran terhadap nilai sebenarnya. Prosedur uji akurasi mengacu pada

metode Rahayu et al. (2010) dengan penyesuaian pada preparasi sampel hasil maserasi. Filtrat hasil maserasi dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan 1 mL larutan baku kurkumin 20 ppm. Selanjutnya ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas dan dihomogenkan. Sebanyak 1 mL larutan tersebut dipipet ke dalam gelas beker, kemudian ditambahkan 20 mg asam borat dan 20 mg asam oksalat. Campuran ditutup menggunakan plastik hitam, dipanaskan pada penangas air selama 10 menit, kemudian didinginkan. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan anhidrida asam asetat hingga tanda batas, kemudian dihomogenkan. Selanjutnya absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Tahapan pembentukan kompleks mengikuti prosedur Rahayu et al. (2010). Pengujian dilakukan terhadap dua sampel, masing-masing sebanyak tiga kali replikasi.

Persen perolehan kembali dihitung menggunakan persamaan:

I. Analisis Data

Data absorbansi dan konsentrasi dianalisis secara deskriptif kuantitatif. Hasil penetapan kadar kurkumin disajikan dalam bentuk tabel dan dibahas berdasarkan kesesuaian dengan prinsip analisis spektrofotometri UV-Vis.