

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini tergolong penelitian yang bersifat eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui perbandingan kadar fenolik ekstrak rimpang jeringau segar dan ekstrak hasil fermentasi . Setiap ekstrak penetapan kadar dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

Tahapan penelitian ini meliputi pemanenan bahan rimpang jeringau, fermentasi rimpang jeringau (*Acorus calamus*), ekstraksi rimpang jeringau yang telah difermentasi, skrining fitokimia, penentuan kadar fenolik menggunakan spektrofotometer UV-Vis, analisis data, dan pembuatan kesimpulan.

#### **3.2 Populasi dan Sampel**

##### **3.2.1 Populasi Penelitian**

Populasi dalam penelitian ini adalah ekstrak rimpang jeringau segar dan terfermentasi

##### **3.2.2 Sampel Penelitian**

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak rimpang jeringau segar dan tefermentasi

#### **3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **3.3.1 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Farmakognosi, dan Instrument Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang

##### **3.3.2 Waktu Penelitian**

Waktu penelitian dilaksanakan mulai penyusunan proposal sampai terselesaikannya karya tulis ilmiah ini yaitu pada bulan November 2018 sampai Juni 2019

### 3.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak rimpang jeringau segar, ekstrak rimpang jeringau terfermentasi, dan kadar fenolik. Definisi operasional tertera pada tabel di bawah ini.

**Tabel 3. 4 Definisi Operasional Variabel**

Variable	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
<b>Variabel Bebas</b> Ekstrak rimpang jeringau segar dan terfermentasi	Hasil ekstraksi rimpang jeringau segar dan terfermentasi, menggunakan pelarut etanol 70%	Timbangan	Rendemen	Nominal
<b>Variabel Terikat</b> Kadar fenolik ekstrak rimpang jeringau segar dan terfermentasi	Banyaknya senyawa fenolik di dalam ekstrak rimpang jeringau segar dan terfermentasi	Spektrofotometer UV-Vis	Kadar fenolik dalam sampel yang dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat	Nominal

### 3.5 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian tentang pengaruh fermentasi terhadap kadar fenolik ekstrak rimpang jeringau adalah blender, toples, *glasswere*, telenan, pisau, evaporator, timbangan digital, bola hisap, spektrofotometer UV-Vis.

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian tentang pengaruh fermentasi terhadap kadar fenolik ekstrak rimpang jeringau adalah jeringau segar, etanol, HCl pekat, kapas, serbuk Mg, FeCl<sub>3</sub> 10%, Asam galat, reagen *Folin-Ciocalteu*, dan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

### **3.6 Prosedur Penelitian**

#### **3.6.1 Persiapan rimpang jeringau**

Persiapan rimpang jeringau dimulai dari pemanenan rimpang jeringau kemudian dilakukan sortasi basah lalu cuci hingga bersih untuk memisahkan kotoran dan rimpang.

#### **3.6.2 Persiapan fermentasi rimpang jeringau**

Fermentasi dilakukan dengan metode fermentasi alami berdasarkan Adisty (2016), dan Widyasaputra, dkk (2013) yang dimodifikasi. Rimpang jeringau yang telah dipotong ditimbang sebanyak 320 gram, kemudian dibiarkan dalam wadah tertutup selama 8 hari. Hasil fermentasi ditandai dengan melunaknya rimpang dan keluarnya bau khas rimpang jeringau yang sangat menyengat. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk menghindari rimpang jeringau menjadi busuk yang ditandai dengan terbentuknya jamur.

#### **3.6.3 Metode ekstraksi basah rimpang jeringau segar dan terfermentasi**

Ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi basah berdasarkan Rifkowitz (2016), dan Sulasiyah, dkk (2018) yang dimodifikasi. Metode ekstraksi cara basah meliputi persiapan bahan, sortasi, penghancuran, penimbangan masing-masing 60 gram rimpang jeringau segar dan terfermentasi, ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 70% dengan total

perbandingan bahan 1:8. Ekstraksi pertama menggunakan pelarut sebanyak 240 mL selama 24 jam suhu ruang sambil diaduk secara kontinyu, dilanjutkan dengan penyaringan kemudian remaserasi dengan pelarut baru dengan dengan jumlah pelarut 240 mL selama 24 jam, rendaman tersebut disaring menggunakan pompa vakum yang dibantu corong Buchner. Filtrate dipindahkan ke evaporator kemudian di kentalkan di waterbath. Kemudian dihitung rendemennya

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak rimpang jeringau segar/terfermentasi (g)}}{\text{berat rimpang jeringau segar/terfermentasi (g)}} \times 100\%$$

### 3.6.4 Skrining fitokimia

#### 1. Uji Flavonoid

Ekstrak sebanyak 2 mL dipanaskan, kemudian ditambahkan etanol. Ke dalam larutan ditambahkan serbuk magnesium dan ditambahkan HCl. Terbentuk larutan berwarna merah menunjukkan adanya flavonoid (Simaremare, 2014).

Ekstrak etanol/methanol dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah dengan 0,5 mL HCl pekat dan 3-4 pita logam mg. adanya flavonoid ditandai dengan warna merah dan orange tergantung pada struktur flavonoid yang terkandung dalam sampel tersebut.

#### 2. Polifenol dan Tanin

Ekstrak ditambahkan dengan 1mL larutan  $\text{FeCl}_3$  10%. Jika terbentuk warna biru tua , biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol dan tanin (Robinson, 1995., et al dalam Simaremare, 2014)

Sebanyak 3 mL larutan ekstrak uji kemudian ditambahkan gelatin 1%. Positif tanin jika terbentuk endapan (Marlina et al., 2005 dalam Sari, 2017)

### 3.6.5 Penentuan Kadar Fenolik

#### 1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Ditimbang asam galat sebanyak 50 mg, dilarutkan dan ditambahkan aquades ad 100 mL sehingga didapatkan larutan baku induk 500 ppm. Larutan baku induk dipipet 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan reagen *Folin Ciocalteu*, kemudian dikocok dan didiamkan selama 5

menit. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan 2 mL larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20%, dikocok homogen dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan aquades ad 10 mL dan dibaca panjang gelombang pada rentang  $\lambda$  600-800 nm (Sari dan Ayuhecaria, 2017).

#### 2. Penentuan Operating Time

Larutan asam galat yang telah dibuat pada penentuan panjang gelombang maksimal, diamati absorbansi pada panjang gelombang maksimal yang didapatkan tiap 5 menit selama 110 menit.

#### 3. Penentuan Kurva Baku Asam Galat

Larutan asam galat dibuat dalam konsentrasi 100, 200, 250, 300, 400 ppm. Sebanyak 0,2 ml larutan asam galat berbagai konsentrasi ditambahkan 2,3 aquades dan 0,5 ml reagen folin ciocalteu, kocok dan diamkan 5 menit pada suhu 25°C. Tahap selanjutnya sebanyak 3ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20% ditambahkan dalam larutan kemudian dikocok kembali hingga homogen dan didiamkan selama 90 menit pada suhu ruang. Larutan berwarna biru kemudian dianalisis dengan UV-VIS (*Genesys 10S UV-Vis*) pada panjang gelombang

710 nm. Kurva standar dibuat dengan memasukkan konsentrasi asam galat (ppm) terhadap absorbansi.

#### 4. Penetapan Kadar Fenolik Total

Sampel ekstrak rimpang jeringau segar dan terfermentasi ditimbang 10mg dilarutkan dengan etanol 70% ad 10 mL. Sebanyak 0,2 ml larutan ekstrak jeringau ditambahkan 2,3 aquades dan 0,5 ml reagen folin ciocalteu, kocok dan diamkan 5 menit pada suhu 25°C. Tahap selanjutnya sebanyak 3ml larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20% ditambahkan dalam larutan kemudian dikocok kembali hingga homogen dan didiamkan selama 90 menit pada suhu ruang. Larutan berwarna biru kemudian dianalisis dengan UV-VIS pada panjang gelombang 710 nm. Kurva standar dibuat dengan memasukkan konsentrasi asam galat (ppm) terhadap absorbansi.

### 3.7 Analisis Data

Data yang telah diperoleh dari hasil penetapan kadar fenolik selanjutnya dianalisis untuk mendapatkan suatu kesimpulan. Analisa yang digunakan yaitu dengan melihat kadar fenolik kemudian diolah dengan SPSS menggunakan uji *T-test*.