

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental yang ditekankan pada hasil rendemen ekstrak dan kadar antosianin yang dihasilkan dari ekstraksi dengan kombinasi pelarut air-etanol dalam beberapa konsentrasi etanol. Pada penelitian ini terdapat 3 (tiga) tahap, yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan dan tahap akhir.

Pada tahap persiapan hal – hal yang dilakukan antara lain, menentukan populasi dan sampel yang akan digunakan dalam penelitian, menentukan lokasi dan lama waktu penelitian, menentukan bahan dan mempersiapkan alat sesuai dengan kebutuhan penelitian.

Tahap selanjutnya adalah tahap pelaksanaan, dimana pada tahap ini meliputi preparasi sampel yaitu serbuk simplisia rosella dan mempersiapkan pelarut yaitu kombinasi air-etanol dengan beberapa konsentrasi etanol (0%, 30%, 50%, 70%, 96%) untuk proses ekstraksi. Selanjutnya melakukan proses ekstraksi dengan metode MAE hingga diperoleh ekstrak kelopak bunga rosella. Setelah itu dilakukan perhitungan rendemen dan penentuan kadar antosianin menggunakan metode spektrofotometri.

Penelitian ini dilakukan dalam 5 variasi konsentrasi etanol dalam pelarut dengan 3 kali pengulangan. Sehingga diperoleh 15 unit percobaan.

Tabel 3.1 Perlakuan ekstraksi

Konsentrasi etanol	Ulangan
Etanol 0%	Etanol 0%, ulangan ke 1
Etanol 30%	Etanol 0%, ulangan ke 2
Etanol 50%	Etanol 0%, ulangan ke 3
Etanol 70%	Etanol 30%, ulangan ke 1
Etanol 96%	Etanol 30%, ulangan ke 2
	Etanol 30%, ulangan ke 3
	Etanol 50%, ulangan ke 1
	Etanol 50%, ulangan ke 2
	Etanol 50%, ulangan ke 3
	Etanol 70%, ulangan ke 1
	Etanol 70%, ulangan ke 2
	Etanol 70%, ulangan ke 3
	Etanol 96%, ulangan ke 1
	Etanol 96%, ulangan ke 2
	Etanol 96%, ulangan ke 3

Tahap akhir mencakup analisa data dan mengambil kesimpulan terkait hasil rendemen ekstrak dan kadar antosianin yang dihasilkan dari proses ekstraksi dengan masing – masing pelarut.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah ekstrak kelopak bunga rosella yang dihasilkan dari proses ekstraksi dengan kombinasi pelarut air-etanol pada konsentrasi etanol 0%, 30%, 50%, 70% dan 96%.

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah sebagian dari ekstrak kelopak bunga rosella yang dihasilkan dari proses ekstraksi dengan kombinasi pelarut air-etanol pada konsentrasi 0%, 30%, 50%, 70% dan 96%.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di beberapa tempat yaitu di Materia Medica Batu untuk pengambilan bahan yaitu serbuk simplisia bunga rosella, Institut Atsiri Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Waktu penelitian dilaksanakan mulai bulan Februari 2020 hingga Mei 2020.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel yang digunakan pada penelitian ini meliputi variabel bebas, terikat dan tetap. Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi variabel terikat yaitu konsentrasi etanol pada kombinasi pelarut air-etanol sebagai pelarut yang digunakan untuk proses ekstraksi. Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas yaitu prosentase rendemen ekstrak dan kadar antosianin yang dihasilkan dari masing – masing ekstraksi. Sedangkan variabel tetap adalah variabel yang dengan sengaja dibuat tetap (konstan) yaitu bobot sampel (serbuk kelopak bunga rosella), volume pelarut, daya alat ekstraksi, dan lama ekstraksi, seperti disajikan pada Tabel 3.1

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat

Peralatan yang digunakan antara lain oven, ayakan no 40, blender, sendok, wadah gelap, gelas ukur, *rotary vaccum evaporator*, corong gelas, *beaker glass*, labu takar, pipet volume, timbangan analitik (Ohaus), pH meter (OAKTAN), microwave oven merk LG MH6343BAK /00 800 W 2450 MHz, spektrofotometer

UV-Vis (Genesys 10S UV-Vis), tabung reaksi, rak tabung reaksi, dan peralatan gelas lain untuk menunjang proses penelitian.

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Bebas	Kombinasi pelarut air-etanol Jumlah konsentrasi etanol yang digunakan sebagai pelarut pada proses ekstraksi dengan metode MAE yaitu 0%, 30%, 50%, 70% dan 96%	Gelas ukur	mL	Nominal
	Rendemen ekstrak Bobot ekstrak yang diperoleh dari masing – masing ekstraksi	Timbangan	Rendemen dalam %	Nominal
Terikat	Kadar antosianin Kadar antosianin yang diukur menggunakan metode spektrofotometri pada panjang gelombang tertentu kemudian dihitung menggunakan rumus	Spektrofotometer UV-Vis	Kadar dalam mg/100 g	Nominal

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah serbuk simplisia kelopak bunga rosella, aquades, etanol 96% , serbuk Kalium clorida (KCl), HCl pekat (PA), HCl 1%, serbuk natrium asetat (CH_3COONa).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Preparasi sampel

Persiapan bahan yaitu serbuk kelopak bunga rosella yang diperoleh dari UPT Materia Medica Batu dihaluskan kembali menggunakan blender kemudian diayak menggunakan pengayak dengan ukuran 40 mesh. Hasil serbuk yang diperoleh digunakan untuk proses standarisasi serbuk simplisia dan proses ekstraksi.

3.7 Uji Parameter Non-Spesifik Serbuk Simplisia Kelopak Bunga Rosella

3.7.1 Penetapan Susut Pengerinan

Susut pengerinan adalah kadar bagian yang menguap suatu zat pada suhu penetapan selama 30 menit atau sampai berat konstan yang dinyatakan sebagai nilai prosen. Kecuali dinyatakan lain, suhu penetapan adalah 105°C (Depkes RI, 1995). Tujuannya adalah untuk memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengerinan. Nilai atau rentang yang diperbolehkan terkait kemurnian dan kontaminasi (Agoes, 2007). Jika tidak dinyatakan lain, nilai untuk susut pengerinan adalah < 10% (Depkes RI, 2000).

Sampel yang akan diukur harus memiliki ukuran kurang dari 2 mm, sehingga jika zat berupa hablur besar, sebelum ditimbang harus digerus terlebih dahulu dengan cepat. Dalam hal khusus (jika bahan tidak mengandung minyak atsiri dan sisa pelarut organik menguap) indentik dengan kadar air, yaitu kandungan air karena berada di atmosfer atau lingkungan udara terbuka (Depkes RI, 1995).

Susut pengerinan ditetapkan sebagai berikut : ditimbang secara seksama 1 gram zat dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu penetapan selama 30 menit dan telah ditara. Zat diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol hingga menjadi lapisan setebal kurang lebih 5-10 mm. Botol kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan tutup botol dibuka. Pengerinan dilakukan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Lalu botol dalam keadaan tertutup dibiarkan mendingin dalam desikator hingga suhu kamar, kemudian ditimbang (Depkes RI, 1995).

Susut pengeringan dinyatakan dalam prosen dan dihitung dengan persamaan

$$\% \text{ susut pengeringan} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\%$$

dimana :

W1 = Bobot sampel awal (gram)

W2 = bobot akhir sampel (diperoleh bobot konstan setelah pengeringan)

3.7.2 Penetapan Kadar Abu (Depkes RI, 1995)

Sebanyak 2-3 gram sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam wadah (krus silikat) yang sebelumnya telah ditimbang dan ditara terlebih dahulu. Setelah itu dipijarkan dalam tanur dengan temperatur $600 \pm 25^\circ\text{C}$ hingga arang habis dan yang tersisa adalah abu putih. Dinginkan dan timbang. Kadar abu total dinyatakan dalam prosen dan dihitung dengan persamaan

$$\% \text{ kadar abu} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100\%$$

dimana :

W = Bobot sampel awal (gram)

W1 = bobot wadah + bobot sampel setelah diabukan (gram)

W2 = bobot wadah (gram)

3.7.3 Penetapan Kadar Sari Larut Air (Depkes RI, 1995)

Serbuk simplisia kering sebanyak 5 gram dimaserasi selama 24 jam dengan pelarut air kloroform P sebanyak 100 mL dalam labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring. Uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar data yang telah ditara, panaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan.

Kadar sari larut air dinyatakan dalam prosen dan dihitung dengan persamaan

$$\% \text{ kadar sari larut air} = \frac{W_2}{W_1} \times \frac{100 \text{ ml}}{20 \text{ ml}} \times 100\%$$

dimana :

W1 = Bobot sampel awal (gram)

W2 = bobot ekstrak setelah dikeringkan

3.7.4 Penetapan Kadar Sari Larut Etanol (Depkes RI, 1995)

Serbuk simplisia kering sebanyak 5 gram dimaserasi selama 24 jam dengan pelarut etanol (95%) sebanyak 100 mL dalam labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring cepat untuk menghindari penguapan etanol. Uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar data yang telah ditara, panaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol (95%), dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan.

3.8 Ekstraksi Kelopak Bunga Rosella menggunakan MAE

3.8.1 Pembuatan pelarut ekstraksi

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi menggunakan aquades (etanol 0%), campuran aquades:etanol dengan konsentrasi etanol 30%; 50%; 70%, dan etanol 96%. Rasio sampel:pelarut adalah 1:5. Untuk menstabilkan senyawa antosianin selama proses ekstraksi ditambahkan larutan HCl 1% dengan perbandingan pelarut : HCl 1% (9:1)

3.8.2 Ekstraksi

Sebelum proses ekstraksi, dilakukan percobaan terhadap waktu didih etanol di bawah *microwave*. Digunakan etanol 96% karena memiliki titik didih yang lebih rendah daripada air, sehingga membutuhkan waktu pemanasan yang lebih pendek.

Waktu yang diperoleh akan digunakan sebagai waktu lama waktu ekstraksi yaitu 5 menit.

Sampel bahan berupa serbuk simplisia kelopak bunga rosella dimasukkan dalam labu alas bulat. Tambahkan campuran pelarut dan HCl 1%, diamkan hingga sampel terendam. Masukkan labu berisi sampel ke dalam microwave. Selanjutnya mengatur waktu *microwave* sesuai dengan variabel yang dikehendaki. Kemudian proses ekstraksi dimulai. Hasil ekstraksi kemudian ditampung dalam beaker glass, didinginkan, dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan dipekatkan menggunakan *waterbath* pada suhu 70°C hingga diperoleh ekstrak kental kelopak bunga rosella.

3.9 Penentuan Rendemen Ekstrak

Perhitungan prosentase rendemen ekstrak dilakukan terhadap masing – masing ekstrak yang dihasilkan.

Rumus :

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{bobot akhir ekstrak}}{\text{bobot serbuk simplisia}} \times 100\%$$

3.10 Penentuan Kadar Antosianin (modifikasi dari (Octaviani et al., 2015))

3.10.1 Pembuatan Larutan Penyangga pH 1 dan pH 4,5

Penentuan kadar antosianin dilakukan dengan metode perbedaan pH yaitu pH 1,0 dan pH 4,5. Pada pH 1,0 antosianin berbentuk senyawa oxonium dan pada pH 4,5 berbentuk karbinol tak berwarna.

Pembuatan larutan pH 1,0 dan pH 4,5

Larutan pH 1,0 dibuat dari KCl sebanyak sekitar 0,186 gram dilarutkan dengan 100 mL aquades. Kemudian ditambahkan HCl pekat sedikit demi sedikit hingga diperoleh pH 1. Sedangkan larutan pH 4,5 dibuat dari $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ sebanyak sekitar 5,443 gram dilarutkan dengan 100 mL aquades. Kemudian ditambahkan HCl 1% sedikit demi sedikit hingga diperoleh pH 4,5

3.10.2 Penentuan λ_{maks}

Penentuan λ maksimum ekstrak kelopak bunga rosella dilakukan dengan metode spektroskopi UV-Vis. Membuat larutan sampel ekstrak kental rosella, kemudian mengukur absorbansi pada panjang gelombang 400 – 700 nm, dan akan ditemukan panjang gelombang 522 nm.

3.10.3 Pengukuran Kadar Antosianin (modifikasi dari (Octaviani et al., 2015))

Membuat larutan induk dari masing – masing ekstrak kental rosella dengan konsentrasi $\pm 10\%$. Kemudian membuat pengenceran 1%, 2%, 4%, 6% dan 8% dari larutan ekstrak 10%. Dari masing-masing pengenceran kemudian diambil sebanyak 4 mL dan dilarutkan dengan 6 mL larutan pH 1 dan 4,5. Kemudian masing – masing diukur absorbansinya pada panjang gelombang 522 nm (panjang gelombang maksimal yang sudah dicari sebelumnya) dan 700 nm.

Kadar antosianin pada ekstrak bunga rosella dapat ditentukan berdasarkan persamaan berikut (Octaviani et al., 2015):

$$\%Antosianin = \frac{Absorbansi}{\varepsilon \times L} \times MV \times DF \times \frac{V}{Wt} \times 100\%$$

Absorbansi dari sampel yang telah dilarutkan (A) ditentukan dengan rumus

$$A = (A_{522} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{522} - A_{700})_{pH4,5}$$

dimana :

- A = absorbansi
- ε = Absorptivitas molar delphinidin-3-sambubioside (29000 L/(mol.cm))
- L = lebar cuvet = 1 cm
- MV = berat molekul delphinidin-3-sambubioside (597,502 g/mol)
- DF = Faktor pengenceran
- V = volume ekstrak pigmen (L)
- Wt = bobot bahan awal (g)

3.11 Analisis Data

Data rendemen ekstrak dan kadar antosianin dari masing-masing ekstraksi dengan kombinasi pelarut air-etanol pada konsentrasi 0%, 30%, 50%, 70% dan 96% kemudian dianalisa secara statistik menggunakan anova satu jalur (*one way anova*) dengan taraf kepercayaan 95% atau nilai signifikansi 0,05, kemudian dilanjutkan dengan tukey untuk melihat perbedaannya secara statistik.