

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan penelitian observasional menggunakan jenis penelitian analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Penelitian observasional analitik adalah penelitian yang dilakukan tanpa adanya kontrol. Penelitian ini menggunakan *cross sectional* karena variabel tergantung dan variabel bebasnya dilakukan dalam waktu yang bersamaan.

B. Waktu dan Lokasi

Tempat penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2023 - Juni 2023.

C. Populasi dan Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak kunyit hitam yang didapatkan dari di Gg. Kenari, Kutu Dukuh, Sinduadi, Kecamatan Mlati, Kabupaten Sleman, Yogyakarta. Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *cluster* sampling dilakukan secara random di daerah *cluster*.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Ekstrak kunyit hitam adalah variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini.

2. Variabel terikat

Kadar IC50 (*inhibition concentration*) merupakan variabel terikat pada penelitian ini.

3. Variabel tergantung

Pelarut metanol, kondisi gelap, waktu inkubasi ABTS, dan suhu yang mempengaruhi metabolit sekunder serta ayakan 40 mesh.

E. Definisi Operasional variabel

Diperlukan definisi tiap variabel pada penelitian ini untuk meminimalisir kesalahan:

1. Kunyit hitam merupakan spesies kunyit yang mempunyai kandungan flavonoid lebih tinggi dibandingkan dengan jenis kunyit lainnya sehingga bisa menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih besar.
2. Aktivitas antioksidan adalah kemampuan ekstrak kunyit hitam dalam menangkal atau memperlambat zat asing/radikal bebas yang berupa ABTS.
3. Konsentrasi ekstrak kunyit hitam yang dapat mengikat 50% radikal bebas ABTS merupakan kadar IC50.
4. Flavonoid merupakan senyawa yang terkandung dalam ekstrak kunyit hitam yang bertindak sebagai senyawa antioksidan alami.

F. Alat dan Bahan

1. Bahan
Rimpang kunyit hitam merupakan bahan utama dalam penelitian ini yang digunakan. Bahan uji pada penelitian ini adalah ekstrak kunyit hitam, metanol p.a, reagen ABTS *sigma*, natrium asetat, aquadest, aluminium foil, FeCl₃, AlCl₃, kuersetin, dan kalium persulfat.
2. Alat
Penelitian ini memerlukan alat- alat yaitu bejana, alat-alat gelas, oven, spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S*), blender, kertas saring, timbangan analitik (*OHAUS*), mikropipet, corong, pisau, *moisture analyzers (OHAUS)* dan ayakan.

G. Pelaksanaan penelitian

1. Determinasi Tanaman
Rimpang tanaman kunyit hitam dideterminasi untuk menentukan bahwa benar sampel yang digunakan adalah kunyit hitam. Determinasi dilakukan dengan cara melihat ciri-ciri, sifat, dan spesies nya.
2. Penyiapan Bahan
 - a. Pembuatan serbuk simplisia

Rimpang kunyit hitam sebanyak 1 kg yang diperoleh dari Gg. Kenari, Kutu Dukuh, Sinduadi, Kecamatan Mlati, Kabupaten Sleman, Yogyakarta, dilakukan disortasi basah dengan cara memisahkan kotoran seperti tanah dan akar-akar yang masih ikut terbawa. Kemudian dilakukan pencucian dengan air mengalir agar bersih dari sisa-sisa kotoran pada rimpang kunyit hitam, lalu diangin-anginkan agar rimpang kunyit hitam kering, setelah itu, dirajang kecil-kecil, dan dioven selama 48 jam pada suhu 45°C sampai kering atau benar-benar tidak terdapat kandungan air. Kemudian dilakukan sortasi kering serbuk simplisia dengan cara rimpang yang sudah diperoleh sebelumnya dihaluskan menggunakan blender kemudian diayak dengan ayakan 40 mesh untuk diperoleh serbuk homogen. Selanjutnya dilakukan pengukuran susut pengeringan menggunakan *moisture analyzers*.

b. Pembuatan ekstrak kunyit hitam

- 1) Ditimbang kurang lebih 250 g serbuk kunyit hitam.
- 2) Dimasukan kedalam bejana atau toples.
- 3) Ditambahkan pelarut metanol sebanyak 1 L. Ekstraksi dilakukan dalam waktu 3 x 24 jam dengan 12 jam sekali pengadukan.
- 4) Untuk memperoleh hasil filtrat, dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring.
- 5) Residu hasil penyaringan dilakukan remaserasi untuk memperoleh sisa filtrat yang masih ada.
- 6) Maserat yang diperoleh disatukan dan dikentalkan menggunakan *waterbath*.
- 7) Dihitung rendemen ekstrak metanol kunyit hitam.

3. Uji Kualitatif

a. Uji Flavonoid

Diambil 1 mL ekstrak kunyit hitam direaksikan dengan 1 mL AlCl_3 , lalu perhatikan warna yang terbentuk apabila larutan berubah menjadi warna kuning menandakan adanya kandungan flavonoid pada ekstrak metanol kunyit hitam (Nurmila et al., 2019).

b. Uji Fenolik

Diambil 1 mL ekstrak kunyit hitam direaksikan dengan 2 tetes FeCl_3 5%. Perhatikan perubahan warna yang terjadi apabila membentuk warna hijau kehitaman menunjukkan bahwa ekstrak kunyit hitam positif mengandung fenolik (Manongko et al., 2020).

c. Uji Tanin

Diambil 1 mL ekstrak kunyit hitam direaksikan dengan 2-3 tetes FeCl_3 1%. Perhatikan pembentukan warna yang terjadi apabila menunjukkan warna menjadi biru atau hijau yang kuat menunjukkan bahwa ekstrak kunyit hitam positif mengandung tanin (Manongko et al., 2020).

4. Uji Kuantitatif

a. Penentuan λ maksimal kuersetin

- 1) Diencerkan standar kuersetin 1000 ppm menjadi konsentrasi 60 ppm.
- 2) Diambil 0,5 mL kuersetin 60 ppm ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 1 mL natrium asetat 1 M dan 2,8 mL aquades lalu digojok homogen.
- 3) Dicari absorbansi maksimal pada λ 400-500 nm (Sari et al., 2021).

b. Penentuan *operating time* kuersetin

- 1) Kuersetin 60 ppm diambil sebanyak 0,5 mL, kemudian ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 1 mL natrium asetat 1 M dan 2,8 mL aquades lalu digojok homogen.
- 2) Larutan diukur absorbansinya pada λ maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit selama 60 menit.

c. Pembuatan kurva standar kuersetin

- 1) Standar kuersetin 1000 ppm diencerkan menjadi konsentrasi 20, 30, 40, 60, 70, dan 80 ppm.
- 2) Pada setiap konsentrasi kuersetin diambil 0,5 mL lalu ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 1 mL natrium asetat 1 M dan 2,8 mL aquades lalu digojok homogen dalam tabung reaksi. Diinkubasi selama 12 menit.
- 3) Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ maksimum kuersetin dan OT yang sudah diperoleh, kemudian dibuat kurva

kalibrasi dengan menghubungkan nilai serapan sebagai koordinat (Y) dan konsentrasi larutan standar sebagai (X) (Sari et al., 2021).

- d. Pembuatan ekstrak kunyit hitam 1000 ppm
 - 1) Ditimbang saksama ekstrak metanol kunyit hitam sebanyak 100 mg
 - 2) Metanol digunakan untuk melarutkan ekstrak kunyit hitam pada labu takar 100,0 mL sampai garis batas dan digojok homogen.
 - e. Penentuan kadar flavonoid total ekstrak kunyit hitam.
 - 1) Sampel diambil dari konsentrasi kunyit hitam 1000 ppm sebanyak 1 mL ditambahkan 0,5 mL larutan, 0,1 mL AlCl_3 10%, 1 mL natrium asetat 1 M dan 2,8 mL aquades lalu digojok homogen dalam tabung reaksi diinkubasi selama 12 menit.
 - 2) Diukur absorbansinya pada λ maksimal dan OT spektrofotometer UV-Vis.
 - 3) Dilakukan 3 kali replikasi (Sari et al., 2021).
5. Uji Aktivitas Antioksidan
- a. Pembuatan larutan kalium persulfat 0,002 M
 - 1) Dibuat larutan induk $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ dengan konsentrasi 0,035 M
 - 2) Ditimbang saksama serbuk $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ sebanyak 94,61 mg
 - 3) Dilarutkan menggunakan labu volume 10 mL menggunakan aquades, kemudian menambahkan aquades sampai garis pada labu volume, digojok homogen
 - 4) Diencerkan larutan induk $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ konsentrasi 0,035 M menjadi konsentrasi 0,002 M dengan cara, diambil 286 μL dari larutan induk 0,035 M
 - 5) Dimasukan pada labu volume 5 mL lalu menambahkan aquades sampai garis batas (Saputri et al, 2020).
 - b. Pembuatan larutan ABTS 0,007 M
 - 1) Dibuat larutan induk ABTS dengan konsentrasi 0,02 M
 - 2) Ditimbang saksama serbuk ABTS sebanyak 102,94 mg
 - 3) Dilarutkan pada labu volume 10 mL menggunakan aquades, lalu menambahkan sampai garis batas

- 4) Diencerkan larutan induk ABTS konsentrasi 0,02 M menjadi konsentrasi 0,007 M. Pengambilan 1,75 mL dari larutan baku 0,02 M
 - 5) Dimasukan pada labu volume 5 mL lalu menambahkan aquades sampai garis batas (Saputri et al, 2020).
- c. Pembuatan larutan stok ABTS
- 1) Larutan $K_2S_2O_8$ dan larutan ABTS dicampurkan dengan perbandingan 1:1, lalu ditambahkan aquades sampai 25,0 mL.
 - 2) Disimpan dalam wadah tidak tembus cahaya dan diletakan pada ruang gelap dengan suhu kamar didiamkan selama 12-16 jam.
- d. Pembuatan larutan induk kuersetin 100 ppm
- 1) Ditimbang saksama 100 mg kuersetin
 - 2) Metanol digunakan untuk melarutkan kuersetin pada labu takar 100,0 mL yang ditambahkan sampai garis batas dan digojok homogen, maka didapatkan larutan baku kuersetin konsentrasi 1000 ppm.
 - 3) Diencerkan larutan baku 1000 ppm kuersetin menjadi konsentrasi 100 ppm, dengan mengambil 5,0 mL larutan baku 1000 ppm.
 - 4) Dimasukan pada labu takar 50 mL
 - 5) Metanol ditambahkan hingga garis batas.
- e. Pembuatan ekstrak metanol kunyit hitam 100 ppm
- 1) Diencerkan larutan ekstrak konsentrasi 1000 ppm menjadi 100 ppm dengan cara diambil 5,0 mL larutan induk 1000 ppm
 - 2) Diencerkan pada labu volume 50,0 mL menggunakan metanol sampai garis batas.
- f. Penentuan λ maksimal
- 1) Diambil larutan stok ABTS sebanyak 1,0 mL
 - 2) Pada panjang gelombang 600-800 nm dengan spektrofotometer visibel dibaca serapannya.
 - 3) Dicari absorbansi maksimal larutan stok ABTS.
- g. Pembuatan larutan blanko dan pengukuran serapan larutan blanko ABTS
- 1) Diambil larutan stok ABTS 1 mL

- 2) Dicampurkan dengan metanol pada labu volume 5 mL, selanjutnya ditambahkan hingga garis batas.
 - 3) Dibaca absorbansinya dengan λ maksimum pada spektrofotometer.
- h. Penentuan *Operating Time*
- 1) Larutan baku kuersetin 1 ppm di ambil 1 mL ditambahkan dengan 2 mL larutan ABTS
 - 2) Dibaca absorbansi pada λ maksimum dengan interval waktu 2 menit selama 30 menit (Devi et al., 2022).
- i. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS pada kuersetin
- 1) Dibuat konsentrasi 0,25; 0,5; 1; 2; dan 3 ppm dari larutan induk 100 ppm kuersetin.
 - 2) Pada setiap konsentrasi kuersetin diambil 2,0 mL dan ditambahkan 1,0 mL larutan stok ABTS.
 - 3) Diinkubasi selama 13 menit sesuai OT yang telah diperoleh dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis
- j. Uji aktivitas antioksidan dengan metode ABTS pada sampel
- 1) Dibuat konsentrasi 25, 50, 75, 100 dan 125 ppm dengan diencerkan larutan induk 1000 ppm ekstrak metanol kunyit hitam.
 - 2) Pada setiap konsentrasi ekstrak metanol kunyit hitam diambil 2,0 mL lalu ditambahkan 1,0 mL larutan stok ABTS.
 - 3) Diinkubasi selama 13 menit sesuai dengan OT dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis.

H. Metode Pengolahan dan Analisis data

Data diolah dengan dua yaitu analisis data secara kuantitatif dan kualitatif secara deskriptif, baik dalam bentuk tabel, grafik, maupun narasi. Data yang diperoleh dari uji aktivitas antioksidan diolah dengan analisis statistik menggunakan Uji *T-Test Independent*, uji ini digunakan untuk membandingkan aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol kunyit hitam dan kuersetin dengan metode ABTS.