BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental untuk mengetahui pengaruh perbedaan metode ekstraksi terhadap aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dari ekstrak metanol rimpang jahe merah.

B. Lokasi dan Waktu

Pengujian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Dilaksanakan pada bulan Agustus hingga Oktober 2023.

C. Sampel Penelitian

Tanaman rimpang jahe merah didapatkan dari Kecamatan Gedang Sari, Kabupaten Gunung Kidul, DIY. Sampel tanaman digunakan sebanyak 5 kg, dengan menggunakan bagian rimpang jahe merah yang segar. Rimpang jahe merah dipanen pada musim kemarau pada usia panen 8-10 bulan.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas yaitu ekstrak metanol rimpang jahe merah yang dihasilkan dengan metode maserasi dan UAE.
2. Variabel terikat yaitu nilai IC_{50} .
3. Variabel terkontrol yaitu suhu ekstraksi, rasio pelarut, durasi ekstraksi, dan usia simplisia.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak metanol rimpang jahe merah merupakan ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi maserasi dan UAE dengan pelarut metanol.

2. Nilai IC_{50} ialah suatu konsentrasi yang dapat menghambat 50% radikal bebas dan dinyatakan dalam satuan ppm.
3. Metode UAE merupakan metode yang menggunakan bantuan gelombang ultrasonik pada frekuensi 40 kHz.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Ayakan 40 mesh, batang pengaduk, chamber, grinder (Fomac), kuvet, Neraca analitik (*Ohaus*), oven (*Memmert*), pH-meter, pinset, propipet (*Iwaki Pyrex*), sendok tanduk, seperangkat alat gelas (*Iwaki Pyrex*), seperangkat alat KLT, spatula, Spektrofotometer UV-Vis, *ultrasonic bath* (Cole-parmer), dan *waterbath* (*Memmert* WNB 10 FC).

2. Bahan

Rimpang jahe merah, akuades, asam asetat (CH_3COOH), asam sulfat pekat (H_2SO_4), DPPH, $FeCl_3$, HCl pekat, kertas *whatman* no 1, kloroform, kuersetin, magnesium, metanol *p.a.*, n-heksan, pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff, dan plat KLT G F₂₅₄.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Jahe Merah

Determinasi rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*), dilaksanakan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

2. Penyiapan Sampel

Tanaman jahe merah yang diambil adalah bagian rimpangnya, kemudian disortasi basah untuk menghilangkan kotoran yang menempel dan bahan asing lainnya, dicuci rimpang dengan air mengalir, tiriskan, setelah itu diiris tipis, dan dikeringkan di oven pada suhu 50°C hingga sampel kering atau rapuh ketika dipatahkan, selanjutnya sampel dihaluskan menggunakan grinder sampai diperoleh serbuk. Serbuk diayak dengan ayakan berukuran 40 mesh untuk memperkecil ukuran dari jahe merah (Munadi, 2018).

3. Pembuatan Ekstrak Rimpang Jahe Merah

a. UAE (*Ultrasound Assisted Extraction*)

Metode yang digunakan adalah metode ekstraksi UAE. Desain ekstraksi mengikuti penelitian (Suhendra *et al.*, 2019) dengan rasio pelarut 1:10 selama 30 menit. Perbandingan serbuk sebanyak 25 gram yang dilarutkan dengan 250 mL metanol. Suspensi yang telah diperoleh kemudian diekstraksi menggunakan *ultrasonic bath* selama 30 menit. Hasil ekstraksi berupa filtrat disaring dengan menggunakan kertas *whatman* nomor 1 lalu dipekatkan menggunakan *waterbath* pada suhu 45°C untuk menguapkan pelarut dalam sampel hingga terbentuk ekstrak kental. Hasil ekstrak yang sudah kental ditimbang dan dihitung rendemennya. Perhitungan rendemen dilakukan menggunakan rumus pada persamaan (1).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{bobot simplisia awal (gram)}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

b. Ekstraksi maserasi

Metode yang digunakan adalah maserasi pada perbandingan 1:10 (Vifta & Hasri, 2022), sebanyak 25 gram serbuk jahe merah dimasukkan dalam wadah lalu tambahkan pelarut metanol sebanyak 250 mL dan direndam selama 3x24 jam. Setelah itu disaring sampel dengan kertas *whatman* nomor 1 dan ditampung filtranya, lalu pekatkan filtrat dengan *waterbath* pada suhu 45°C untuk menguapkan pelarut dalam sampel hingga terbentuk ekstrak kental (Munadi, 2018). Hasil ekstrak yang sudah kental ditimbang dan dihitung rendemennya. Perhitungan rendemen dilakukan menggunakan persamaan (1).

4. Kontrol Kualitas Ekstrak

a. Uji organoleptik ekstrak

Uji organoleptik merupakan pengujian yang melibatkan indera manusia seperti (aroma, tekstur, dan warna) sebagai media dalam pengukuran daya terima terhadap suatu produk (Ayustaningwarno, 2014).

b. Uji fitokimia

1) Alkaloid

10 mg masing-masing ekstrak dilarutkan dengan 1 mL HCl dan 9 mL akuades, lalu panaskan sekitar 2 menit, setelah dipanaskan saring lalu diambil filtratnya. Disiapkan 3 tabung reaksi dan masukkan 0,5 mL filtrat. Setiap tabung ditetesi 2 tetes pereaksi Dragendorff, Mayer dan Wagner. Apabila hasilnya positif akan terbentuk endapan jingga jika menggunakan pereaksi Dragendorff, endapan kuning jika menggunakan pereaksi Mayer serta endapan berwarna kecoklatan jika menggunakan pereaksi wagner (Munadi, 2018).

2) Flavonoid

10 mg masing-masing ekstrak dimasukkan pada tabung reaksi, lalu dimasukkan 2 mL H_2SO_4 . Jika sampel berubah warna menjadi merah, kuning atau coklat positif mengandung flavonoid (Munadi, 2018).

3) Saponin

10 mg masing-masing ekstrak dimasukkan pada tabung reaksi, dan tambahkan air hangat 10 mL, dikocok sekitar 30 detik, kemudian dilihat perubahannya. Jika terdapat busa dan tidak hilang sekitar 30 detik tandanya mengandung saponin (Munadi, 2018).

4) Tanin

10 mg masing-masing ekstrak dimasukkan pada tabung reaksi, lalu tambahkan 1 mL $FeCl_3$. Jika sampel berubah warna menjadi hijau kehitaman positif mengandung tanin (Munadi, 2018).

5) Terpenoid

10 mg masing-masing ekstrak dimasukkan ke tabung reaksi, lalu tambahkan kloroform 0,5 mL dan asam asetat 0,5 mL lalu dinginkan. Setelah dingin, tambahkan 2 mL asam sulfat pekat melalui pinggir tabung. Jika positif mengandung terpenoid terbentuk cincin berwarna coklat (Munadi, 2018).

5. Kromatografi Lapis Tipis

a. Pembuatan fase gerak dan penjenjuran bejana

Sebanyak 10 mL campuran kloroform, metanol, dan etil asetat dengan perbandingan (5:3:2) digunakan sebagai fase gerak, kemudian masukkan fase gerak dalam bejana (chamber) dan diberi kertas saring sebagai indikator kejenuhan. Ditunggu bejana kromatografi (chamber) lalu didiamkan hingga kertas saring basah oleh fase gerak. Penelitian ini menggunakan plat silika gel G F₂₅₄. Beberapa optimasi fase gerak dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Optimasi Fase Gerak

No	Fase Gerak
1	n-Heksan : Etil Asetat (9:1)
2	Etil Asetat : n-Heksan (8:2)
3	Butanol : Asam Glisial : Aquades(4:1:5)
4	Kloroform : Metanol : Etil Asetat (5:3:2)

b. Pembuatan larutan uji

Dibuat masing-masing ekstrak dengan konsentrasi 10%, ditimbang ekstrak 1 g dan larutkan dengan 10 mL metanol *p.a* menggunakan labu ukur dan tambahkan pelarut sampai tanda batas (Depkes, 2017). Perbandingan yang digunakan adalah kuersetin yang dibuat dengan konsentrasi 0,1%, ditimbang kuersetin sebanyak 10 mg lalu larutkan dengan dengan 10 mL metanol *p.a* dan homogenkan (Muhafidzah *et al.*, 2018).

c. Prosedur KLT

Plat KLT dengan lebar dan panjang 4 x10 cm, dikeringkan menggunakan oven pada suhu 100°C selama 5 menit untuk memastikan kelembaban pada plat hilang sehingga daya serap lebih maksimal, kemudian beri garis batas atas dan bawah pada plat KLT sekitar 1 cm (Nadalia, 2021). Ditotolkan masing-masing ekstrak dan standar kuersetin dengan jarak 1 cm pada plat KLT. Dimasukkan plat KLT ke dalam chamber yang sudah jenuh, kemudian diamati hingga eluen naik pada plat KLT. Dikeluarkan plat KLT dan dikeringkan, kemudian diamati bercak pada sinar tampak, UV pada

panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Perhitungan nilai Rf dapat dilakukan menggunakan rumus pada persamaan (2) (Depkes, 2017).

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}} \dots\dots\dots(2)$$

6. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Prosedur antioksidan mengacu penelitian yang dilakukan oleh (Fauzi & Santoso, 2021) yang sudah dilakukan penyesuaian.

a. Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM

Ditimbang 3,9 mg serbuk DPPH (Berat Molekul 394,32), lalu larutkan dalam 100 mL metanol *p.a.*, dan didapatkan konsentrasi 100 ppm.

b. Penentuan panjang gelombang DPPH

Diambil 2 mL larutan DPPH lalu masukkan dalam kuvet, lalu ukur absorbansinya dengan panjang gelombang 400 - 600 nm pada metode spektrofotometri UV-Vis. Hasil panjang gelombang maksimal DPPH yang diperoleh yaitu 515 nm.

c. Penentuan *operating time*

Diambil 1 mL kuersetin lalu tambahkan 2 mL larutan DPPH, setelah itu diamati absorbansinya tiap menit dengan rentang 0-60 menit dengan panjang gelombang maksimum 515 nm dan diperoleh hasil OT yaitu pada menit ke-32.

d. Pembuatan serapan blanko

Diambil 1 mL DPPH, setelah itu didiamkan selama OT lalu ukur pada panjang gelombang 515 nm.

e. Pembuatan larutan induk kuersetin 100 ppm

Dibuat kuersetin pada konsentrasi 100 ppm dengan menimbang 10 mg kuersetin, kemudian larutkan dengan 100 mL metanol *p.a.* (Cahyani, 2017).

f. Pembuatan larutan seri kadar kuersetin

Larutan seri kuersetin dibuat dengan konsentrasi 2 ppm, 2.5ppm, 3 ppm, 3.5 ppm dan 4 ppm. Masing-masing larutan diambil dari larutan induk kuersetin 100 ppm sebanyak 0.1 mL, 0.125 mL, 0.150 mL, dan 0.175 mL,

dan 0,2 mL, setelah itu masukkan dalam labu ukur 5 mL lalu ditambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas.

g. Pengujian DPPH dengan pembanding kuersetin

Diambil larutan kuersetin sebanyak 1000 μ l dan DPPH sebanyak 2000 μ l, dimasukkan dalam tabung reaksi yang dilapisi aluminium foil. Campuran digojog dan diamankan selama *operating time* ditempat gelap. Diamati absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang didapat (Patria & Soegihardjo, 2013).

h. Pembuatan larutan induk sampel maserasi dan UAE 1000 ppm

Ditimbang masing-masing ekstrak sebanyak 25 mg lalu larutkan dalam 25 mL metanol *p.a* dan digojog sampai homogen (Munadi, 2018).

i. Pembuatan larutan seri kadar sampel maserasi dan UAE

Dibuat larutan uji masing-masing ekstrak pada konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 20ppm, dan 40 ppm, kemudian masing-masing diambil dari larutan induk sampel 1000 ppm sebanyak 0.025 mL, 0.05 mL, 0.1 mL, 0.2 mL, setelah itu masukkan kedalam labu ukur 5 mL dan tambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas (Munadi, 2018).

j. Pengujian DPPH dan sampel maserasi dan UAE

Diambil masing-masing ekstrak jahe merah sebanyak 1000 μ L ditambahkan 2000 μ L DPPH, lalu masukkan dalam tabung reaksi yang dilapisi aluminium foil. Campuran digojog dan diamankan selama *operating time* ditempat gelap. Diamati absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang didapat (Patria & Soegihardjo, 2013).

H. Metode Pengolahan Data

1. Perhitungan IC₅₀

Pada pengujian aktivitas antioksidan ini, metode DPPH digunakan untuk meredam radikal bebas yang dinyatakan dari *inhibisi concentration* 50% atau IC₅₀. IC₅₀ merupakan parameter yang digunakan dalam menentukan kemampuan dari antioksidan dalam meredam radikal bebas. Semakin kecil nilai dari IC₅₀ maka semakin besar pula aktivitas antioksidannya. Metode ini juga

digunakan karna memiliki waktu yang cepat, sederhana, membutuhkan sedikit sampel serta mudah digunakan. Aktivitas antioksidan diukur dengan mengamati perubahan warna ungu DPPH, yang menunjukkan penurunan konsentrasi DPPH. Perhitungan % inhibisi radikal bebas DPPH dapat dilihat pada rumus di persamaan (3).

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi larutan DPPH} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi larutan DPPH}} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

Persamaan regresi linear didapatkan dari persentase inhibisi masing-masing perlakuan. Persamaan yang didapatkan yaitu $y = bx + a$, x yaitu konsentrasi (ppm) dan y yaitu persentase inhibisi.

2. Analisis Data

Dalam penelitian ini, data dianalisis menggunakan uji normalitas Shapiro-Wilk dan uji homogenitas Levene's. Kedua uji menunjukkan data terdistribusi normal, maka analisis dapat dilanjutkan dengan uji One Way Anova yang diolah menggunakan SPSS. Metode One Way Anova dipilih karena penelitian ini akan membandingkan % penangkapan radikal DPPH dari dua ekstrak. Data yang diperoleh terdapat perbedaan signifikan yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi $<0,05$.