

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini berjenis pendekatan observasional analitik yang dimulai dari ekstraksi jahe hitam dengan teknik merendam serbuk simplisa dalam etanol 96%. Hasil ekstraksi dilanjutkan dengan analisis kualitatif pada uji tabung untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder, serta analisis kuantitatif untuk mengetahui kandungan fenolik total dengan spektrofotometri UV-Vis dan aktivitas peredaman radikal bebas dengan metode ABTS yang hasilnya dilihat berdasarkan nilai IC_{50} .

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Prodi (S-1) Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei hingga Juni 2024.

C. Populasi dan Sampel

Sampel dalam penelitian ini memanfaatkan rimpang jahe hitam usia 8 – 12 bulan dengan teknik pengambilan *random sampling*, dimana sampel diperoleh di Jl. Profesor Herman Johannes Sagan CT V/8 RT 03/RW 02, Gg Menur, Catur Tunggal, Depok, Sleman, Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Terikat : kandungan fenolik total serta nilai aktivitas peredaman radikal bebas dalam bentuk IC_{50} .
2. Variabel Bebas : variasi konsentrasi dalam uji kadar fenolik dan aktivitas peredaman radikal bebas pada ekstrak jahe hitam.
3. Variabel Terkontrol : usia panen rimpang 11 bulan, lama waktu maserasi 72 jam, suhu pengeringan yaitu $50^{\circ}C$, waktu pengeringan selama 48 jam, dan pengayak 60 mesh.

E. Definisi Operasional

1. Suhu pengeringan merupakan suhu yang dibutuhkan untuk mengeringkan tanaman sebelum dilakukannya maserasi dan proses ekstraksi. Suhu pengeringan yang digunakan ialah 50°C.
2. Waktu maserasi merupakan waktu yang dibutuhkan untuk perendaman serbuk jahe hitam sebelum dilakukan ekstraksi. Waktu yang digunakan ialah selama 72 jam.
3. Rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora*) merupakan sampel yang akan diteliti kandungan fenolik total serta aktivitas peredaman radikal bebas. Rimpang jahe hitam diperoleh di Catur Tunggal Depok, Kabupaten Sleman, Yogyakarta.
4. Kandungan fenolik total merupakan kadar atau konsentrasi senyawa fenolik yang berada pada sampel jahe hitam. Kandungan total fenolik dapat dihitung menggunakan nilai absorbansi yang sudah ditetapkan kurva linearitas dari sampel dengan spektrofotometri UV-Vis.
5. Aktivitas peredaman radikal bebas merupakan pengujian untuk mengetahui kadar antioksidan dengan metode ABTS dan hasilnya akan dinyatakan dalam bentuk IC₅₀.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Menggunakan alat-alat gelas (*Iwaki*), timbangan analitik (*Ohaus*), grinder (*Formac*), bejana, oven (*Binder*), pipet volume (*Iwaki*), mikropipet 100 – 1000 µL (*Eppendorf & Ohaus*), mikropipet 10 – 100 µL (*Dragon Lab*), cawan porselin (Lokal), ayakan 60 mesh (*Test Scieve*), *moisture analyzers* (*Ohaus*), vortex (*Ohaus*), sonikator, kuvet, dan spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer*).

2. Bahan

Rimpang jahe hitam kemudian dijadikan ekstrak, etanol 96%, metanol *p.a* (*Merck*), reagen ABTS (*Sigma*), asam galat *p.a* (*Sigma*), HCl pekat (*Mallinckrodt*), pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, *aquadest*, FeCl₃, kalium persulfat (K₂S₂O₈), Na₂CO₃ (*Merck*),

Folin-Ciocalteu (*Merck*), gelatin (teknis), NaCl (teknis), serbuk magnesium, dan *blue tip* (Lokal).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan Penelitian

a. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan berfungsi untuk memastikan bahwa sampel yang digunakan untuk penelitian sudah benar yaitu jahe hitam. Proses determinasi tanaman rimpang jahe hitam dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

b. Persiapan Sampel

Rimpang jahe hitam disortasi basah untuk memisahkan kotoran-kotoran dari rimpang, kemudian dibersihkan rimpang jahe hitam menggunakan air mengalir, tiriskan dan dirajang tipis. Selanjutnya dikering anginkan dan dioven pada suhu 50°C selama 48 jam. Diukur kadar air dari simplisia yang sudah kering menggunakan *moisture analyzers*. Setelah itu dihaluskan rimpang jahe hitam yang telah kering dengan grinder, diayak dengan ayakan 60 mesh sehingga akan didapatkan serbuk simplisia halus (Nugraha *et al.*, 2017).

2. Pelaksanaan Penelitian

a. Pembuatan Ekstrak Jahe Hitam

Metode yang digunakan berdasarkan penelitian (Anwar *et al.*, 2022) dengan beberapa modifikasi:

Ekstrak jahe hitam dibuat dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi. Sejumlah 100 g serbuk jahe hitam dilarutkan pada etanol 96% sebanyak 600 mL. Ditempatkan di dalam bejana/wadah yang terlindung dari sinar matahari. Dilakukan perendaman selama 3 x 24 jam dan diaduk tiap 8 jam selama 1 menit, kemudian setelah 3 hari dilakukan penyaringan menggunakan kain mori. Residu yang masih ada dilakukan remaserasi menggunakan waktu dan jenis pelarut yang sama seperti maserasi awal dengan perbandingan pelarut 1:3. Hasil kedua

maserat disatukan dan diuapkan pada suhu 50°C sehingga akan diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang dan dihitung nilai persentase rendemen, yaitu dengan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental (g)}}{\text{Bobot sampel awal (g)}} \times 100\%$$

b. Uji Organoleptik

Ekstrak etanol 96% jahe hitam dilakukan uji organoleptik yang meliputi bau, warna, dan tekstur.

c. Skrining Fitokimia

1) Flavonoid

Panaskan 2 mL ekstrak etanol 96% jahe hitam selama 5 menit, tambahkan magnesium 0,2 g dan HCl pekat 5 tetes. Hasil positif flavonoid apabila terjadi perubahan warna kuning hingga merah (Munadi & Arifin, 2022).

2) Fenolik

Sejumlah 2 mL ekstrak etanol 96% jahe hitam direaksikan dengan 2 tetes FeCl_3 5%. Amati perubahan warna, bila terbentuk warna hijau kehitaman maka menunjukkan positif fenolik (Manongko *et al.*, 2020).

3) Alkaloid

Sejumlah 3 mL ekstrak etanol 96% jahe hitam dilarutkan dengan 3 mL HCl 2 N. Tempatkan larutan sebanyak 2-3 tetes ke dalam *drop plate*, kemudian tambahkan reagen Wagner, Mayer, dan Dragendoff sebanyak 3 tetes. Hasil positif alkaloid apabila pada *plate* dengan reagen Wagner terbentuk endapan cokelat, *plate* reagen Mayer terbentuk endapan putih kekuningan, dan pada *plate* reagen Dragendoff terbentuk endapan jingga (Munadi & Arifin, 2022).

4) Tanin (Gelatin test)

Sejumlah 2 mL ekstrak etanol 96% jahe hitam direaksikan dengan 10 mL larutan NaCl 10%, lalu tambahkan larutan gelatin

1%. Apabila terbentuk endapan putih kekuningan maka menunjukkan positif tanin.

5) Saponin

Sejumlah 2 mL ekstrak etanol 96% jahe hitam tambahkan dengan 10 mL *aquadest* lalu digojog $\pm$ 30 detik, amati perubahan. Apabila membentuk busa pada larutan tidak kurang selama 30 detik maka menunjukkan positif saponin (Munadi & Arifin, 2022).

d. Uji Kuantitatif Fenolik Total

1) Pembuatan larutan induk asam galat

Ditimbang asam galat 100,0 mg untuk membuat larutan standar asam galat 1000 ppm, kemudian larutkan dalam labu ukur menggunakan metanol *p.a* hingga mencapai volume 100,0 mL. Sebanyak 2,5 mL diambil dari larutan stok, kemudian encerkan dengan metanol *p.a* hingga mencapai volume 25 mL sehingga menghasilkan konsentrasi 100 ppm (Ahmad *et al.*, 2015).

2) Penentuan *Operating Time* (OT)

Tambahkan 1,5 mL reagen Folin-Ciocalteu ke dalam 300 μ L asam galat konsentrasi 30 ppm, lalu gojog dan diamkan selama 3 menit. Tambahkan 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5%, gojog homogen, ukur absorbansi pada rentang 0 – 60 menit dengan λ 770 (Andriani & Murtisiwi, 2018).

3) Penentuan λ maksimum

Tambahkan reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 1,5 mL ke dalam 300 μ L asam galat konsentrasi 30 ppm, lalu gojog dan diamkan 3 menit. Tambahkan 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5%, gojog homogen, inkubasi pada OT yang telah diperoleh dalam suhu ruang, kemudian ukur absorbansi pada *range* λ 600 – 800 nm.

4) Pembuatan kurva baku asam galat

Larutan induk asam galat 100 ppm diencerkan menjadi seri konsentrasi 30, 40, 50, 60, dan 70 ppm. Ambil 300 μ L larutan tiap seri konsentrasi dan dimasukkan dalam tabung. Tambahkan 1,5 mL

reagen Folin-Ciocalteu, gojog dan diamkan 3 menit. Larutan Na_2CO_3 7,5% sejumlah 1,2 mL ditambahkan ke dalam tabung, gojog homogen dan inkubasi pada OT yang telah diperoleh. Baca absorbansi masing-masing larutan pada λ optimum. Selanjutnya buat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (ppm) dengan absorbansi.

5) Pembuatan larutan ekstrak jahe hitam 10.000 ppm

Dibuat larutan ekstrak jahe hitam dengan konsentrasi 10.000 ppm dengan menimbang 100,0 mg ekstrak jahe hitam, lalu tambahkan metanol *p.a* dalam labu ukur 10 mL.

6) Pembuatan larutan ekstrak jahe hitam 4000 ppm

Diambil 2 mL larutan ekstrak jahe hitam dari konsentrasi 10.000 ppm, kemudian tambahkan metanol *p.a* dalam labu ukur 5 mL sehingga menjadi konsentrasi 4000 ppm.

7) Pengujian kadar fenolik total

Larutan ekstrak jahe hitam dipipet sebanyak 300 μL dan tambahkan 1,5 mL reagen Folin-Ciocalteu, lalu gojog dan diamkan selama 3 menit, kemudian tambahkan 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5% gojog homogen dan inkubasi pada OT yang telah diperoleh dan serapan diukur pada λ 770 nm. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali pada uji ini sehingga akan didapatkan nilai fenolik total yaitu dalam mg GAE/g ekstrak.

e. Uji Peredaman Radikal Bebas Dengan Metode ABTS

1) Pembuatan larutan ABTS

a) Pembuatan larutan kalium persulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 0,002 M

Dibuat larutan induk kalium persulfat konsentrasi 0,035 M dengan menimbang secara saksama serbuk kalium persulfat sebanyak 94,61 mg. Larutkan hingga garis batas dalam labu ukur 10 mL menggunakan *aquadest*, gojog homogen. Dilakukan pengenceran larutan induk kalium persulfat konsentrasi 0,035 M menjadi konsentrasi 0,002 M dengan

mengambil 286 μL dari larutan induk 0,035 M, kemudian masukkan dalam labu ukur 5 mL, tambahkan *aquadest* hingga garis batas, gojog homogen (Tanesib *et al.*, 2023).

b) Pembuatan larutan ABTS 0,007 M

Dibuat larutan induk ABTS konsentrasi 0,02 M dengan menimbang secara saksama serbuk ABTS sebanyak 102,94 mg, tambahkan ke dalam labu ukur 10 mL *aquadest* sebagai pelarut, lalu tambahkan *aquadest* hingga garis batas, gojog homogen. Dilakukan pengenceran larutan induk ABTS konsentrasi 0,02 M menjadi konsentrasi 0,007 M dengan mengambil 1,75 mL dari larutan induk 0,02 M, kemudian masukkan dalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan *aquadest* sampai garis batas, gojog homogen (Tanesib *et al.*, 2023).

c) Pembuatan larutan stok

Tambahkan 5 mL kalium persulfat ke dalam 5 mL larutan ABTS, lalu metanol *p.a* ditambahkan sampai 25 mL. Lakukan inkubasi di tempat gelap pada suhu 22 – 24°C selama 12 – 16 jam (Saputri *et al.*, 2020).

2) Pembuatan larutan asam galat

Dibuat seri konsentrasi dari larutan induk asam galat 100 ppm menjadi 0,2; 0,6; 1; 1,4; dan 1,8 ppm, kemudian ditambahkan metanol *p.a* dalam labu ukur 5 mL.

3) Pembuatan larutan sampel ekstrak jahe hitam 10.000 ppm dan 5000 ppm

Timbang 100,0 mg ekstrak jahe hitam, lalu tambahkan metanol *p.a* dalam labu ukur 10 mL sehingga menjadi konsentrasi 10.000 ppm. Larutan diambil 2,5 mL dan ditambahkan metanol *p.a* dalam labu ukur 5 mL sehingga menjadi konsnetrasi 5000 ppm.

4) Penentuan *operating time* (OT)

Masukkan larutan ABTS 1 mL ke dalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan metanol *p.a*. Larutan dihomogenkan dengan

divortex selama 1 menit, lalu dilakukan pembacaan absorbansi dari menit ke-1 sampai menit ke-45 dengan interval setiap 1 menit pada λ optimal teoritis ABTS (Pujiastuti *et al.*, 2022).

5) Penentuan λ maksimum

Masukkan larutan ABTS 1 mL ke dalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan metanol *p.a.* Larutan diinkubasi pada OT yang telah diperoleh, lalu diukur serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ antara 600 – 800 nm.

6) Uji aktivitas peredaman radikal bebas ABTS pada asam galat

Ambil 1 mL dari masing-masing larutan stok asam galat, kemudian tambahkan 2 mL larutan ABTS, dan inkubasi pada OT yang telah diperoleh selama 27 menit. Setelah itu ukur serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 741 nm.

7) Uji aktivitas peredaman radikal bebas ABTS pada sampel jahe hitam

Ekstrak jahe hitam diencerkan menjadi konsentrasi 600, 700, 800, 900, dan 1000 ppm. Diambil 1 mL sampel dari tiap konsentrasi kemudian direaksikan dengan 2 mL ABTS. Lakukan inkubasi pada OT yang telah diperoleh dan baca absorbansi pada λ optimum.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Data yang didapatkan dari hasil pengukuran absorbansi terhadap ekstrak jahe hitam dan asam galat menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dilakukan analisis data secara statistika dengan regresi linier yaitu $y = bx + a$, dimana nilai y menyatakan absorbansi dan nilai x menyatakan kadar/konsentrasi senyawa. Dari data regresi linier digunakan untuk perhitungan kandungan fenolik total dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total Phenolic Content (TPC)} = \frac{C \cdot V \cdot Fp}{g}$$

Ket :

C = Konsentrasi fenolik (nilai x)

V = Volume ekstrak (mL)

Fp = Faktor pengenceran

g = Bobot sampel (g)

Selanjutnya mencari nilai IC_{50} , dimana semakin rendah nilai IC_{50} artinya senyawa uji semakin baik dalam menangkal radikal ABTS (Nugraha *et al.*, 2017). Hasil IC_{50} dibandingkan dengan IC_{50} teoritis yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kategori Antioksidan Berdasarkan Nilai IC_{50} (Muthia *et al.*, 2024)

Kategori Antioksidan	IC_{50} (ppm)
Sangat aktif	<50
Aktif	50-100
Sedang	101-150
Lemah	151-200
Sangat Lemah	>200