

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian observasional dengan metode deskriptif dan analitik. Metode deskriptif digunakan untuk melihat ada tidaknya kandungan senyawa flavonoid, fenolik, alkaloid, tanin, dan steroid/terpenoid pada sampel. Metode analitik digunakan untuk menganalisis kadar senyawa flavonoid total menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan kuersetin sebagai standar dan analisis aktivitas peredaman radikal bebas DPPH pada ekstrak rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora*) dalam pelarut etanol 96% dengan parameter IC₅₀.

B. Lokasi dan Waktu

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini bertempat di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei hingga Juni 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker yang diperoleh dari Desa Caturtunggal, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini menggunakan rimpang *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker dengan teknik pengambilan sampel *simple random sampling* yang mana sampel diambil dari populasi secara acak tanpa mempertimbangkan strata yang ada.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora*).
2. Variabel Terikat : kadar flavonoid total dan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH (IC₅₀) ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora*).
3. Variabel Terkendali : Umur panen rimpang (1,5 tahun), waktu maserasi (2x24 jam), suhu evaporasi (50°C), pengayakan (60 mesh), suhu, dan tempat penyimpanan larutan DPPH (suhu ruang dan terhindar dari cahaya).

E. Definisi Operasional

1. Rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora*) merupakan sampel yang akan dianalisis kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidannya.
2. Ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam diperoleh melalui proses ekstraksi maserasi dari serbuk rimpang jahe hitam menggunakan etanol 96%.
3. Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan ekstrak etanol rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora*) untuk meredam senyawa radikal DPPH.
4. Nilai IC₅₀ (*Inhibitory concentration 50*) ialah konsentrasi ekstrak etanol rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora*) yang dapat meredam radikal bebas DPPH sebesar 50%.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah mikropipet (*Ohaus*), set alat gelas (*Iwaki*), pipet ukur (*Iwaki*), *hot plate*, spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV Vis*), flakon/vial (wadah ekstrak), timbangan analitik (*Ohaus*), timbangan semi mikro (*Ohaus*), *moisture analyzer* (*Ohaus*), sonikator (*GT Sonic*), *water bath* (*Memmert*), toples kaca, dan oven (*Binder*).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu rimpang *Kaempferia parviflora*, etanol 96%, serbuk magnesium, etanol *p.a* (*Merck*), DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil) (*Himedia*), FeCl₃, akuades, HCl pekat, pereaksi dragendorff, pereaksi mayer, pereaksi bouchardat, kuersetin (*Sigma*), asam sulfat

pekat, asam asetat 5%, kloroform, AlCl_3 , asetat anhidrat, kertas saring, aluminium foil, dan *blue tip* (Lokal).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan

a. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman *Kaempferia parviflora* dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

b. Persiapan sampel

Rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora*) yang dikumpulkan kemudian dilakukan proses sortasi basah dengan tujuan agar kotoran yang menempel pada permukaan rimpang dapat dihilangkan. Setelah itu, rimpang yang sudah disortasi basah dicuci sampai bersih. Langkah berikutnya adalah melakukan perajangan pada sampel guna memudahkan proses pengeringan. Pengeringan dilakukan dalam oven suhu 50°C hingga kadar airnya kurang dari 10%. Setelah itu, dilakukan sortasi kering agar simplisia terpisahkan dari pengotornya. Apabila kadar air sudah memenuhi syarat selanjutnya digiling menggunakan grinder lalu dilakukan pengayakan dengan ukuran mesh No 60, kemudian serbuk disimpan dalam wadah bersih dan tertutup rapat (Saragih *et al.*, 2015; Wahyudi & Minarsih, 2023).

2. Pelaksanaan

a. Pembuatan ekstrak *Kaempferia parviflora*

Ekstrak dibuat dengan cara merendam 100 gram serbuk simplisia rimpang jahe hitam menggunakan pelarut etanol 96% (1:10). Proses ini berlangsung selama 48 jam diiringi dengan pengadukan selama beberapa kali. Setelah selesai maserasi dilakukan penyarian menggunakan kain mori agar ampas dan maserat dapat dipisahkan (Leswara & Kurniasih, 2024). Selanjutnya dilakukan remaserasi dengan merendam kembali ampas menggunakan pelarut etanol 96% yang baru (1:5) selama 24 jam. Filtrat yang didapatkan dikumpulkan menjadi satu wadah lalu diuapkan hingga kental pada suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam.

Selanjutnya dilakukan penimbangan untuk dilakukan perhitungan % rendemen dan uji kadar air ekstrak.

Perhitungan rendemen ekstrak dihitung dengan cara menimbang bobot cawan dan ekstrak yang diperoleh, dapat dilihat pada persamaan berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh (gram)}}{\text{bobot simplisia awal (gram)}} \times 100\%$$

b. Uji skrining fitokimia

1) Uji senyawa flavonoid

Diambil ekstrak rimpang jahe hitam sejumlah 50 mg lalu ditambahkan etanol 50 mL, didihkan 5 menit dan saring larutan. Sejumlah 5 mL filtrat yang diperoleh ditambahkan serbuk Mg sebanyak 50 mg, kemudian ke dalamnya dimasukkan sejumlah 1 mL HCl pekat lalu gojog. Jika sampel berubah menjadi warna kuning, jingga, atau merah hal tersebut menunjukkan sampel positif mengandung senyawa flavonoid.

2) Uji senyawa fenolik

Dibuat larutan ekstrak rimpang jahe hitam 1000 ppm dengan cara menimbang 10 mg ekstrak dan melarutkannya dalam etanol teknis ad 10 mL. Larutan ekstrak sejumlah 1 mL direaksikan menggunakan 2 tetes larutan FeCl_3 5%. Lihat perubahan warna yang terbentuk, apabila sampel menjadi warna hijau kehitaman maka dinyatakan sampel mengandung fenolik (Wowor *et al.*, 2022).

3) Uji senyawa tanin

a) Pereaksi FeCl_3

Ditimbang ekstrak 20 mg lalu didihkan selama 3 menit dengan akuades. Selanjutnya diambil 5 mL larutan ekstrak dan direaksikan dengan 1-2 tetes larutan FeCl_3 1%. Diamati perubahan warna yang terbentuk, jika larutan mengalami perubahan warna menjadi coklat kehitaman atau hitam kehijauan maka dinyatakan positif adanya senyawa tanin (Handayani *et al.*, 2023).

b) Pereaksi gelatin

Diambil 2 mL ekstrak kemudian tambahkan dengan sedikit gelatin 1% dan NaCl 10% sejumlah 10 mL dengan perbandingan 1:1. Apabila terbentuk endapan kekuningan menunjukkan adanya senyawa tanin.

4) Uji senyawa alkaloid

Diambil 0,5 g ekstrak dan tambahkan HCl 2N sejumlah 1 mL serta 9 mL akuades, kemudian panaskan larutan selama 2 menit lalu didiamkan hingga dingin dan disaring. Pindahkan filtrat yang diperoleh sebanyak 3 tetes ke dalam masing-masing *plate* dan tambahkan masing-masing 2 tetes reagen Mayer, Dragendorf, dan Bouchardat. Jika terdapat senyawa alkaloid maka endapan kuning atau putih akan terbentuk pada *plate* yang ditambahkan pereaksi Mayer, pada *plate* yang ditambahkan pereaksi Bouchardat akan membentuk endapan coklat sampai hitam, sedangkan pada *plate* yang ditambahkan pereaksi Dragendorf akan membentuk endapan jingga. Positif alkaloid apabila 2 dari 3 reaksi membentuk endapan yang dimaksud (Syahadat & Siregar, 2020).

5) Uji senyawa steroid/terpenoid (Salkowski)

Ditimbang 100 mg ekstrak dan tambahkan kloroform sebanyak 2 mL, lalu digojog dan disaring. Selanjutnya filtrat yang diperoleh ditambahkan H₂SO₄ pekat sejumlah 2 mL melalui dinding tabung reaksi. Apabila warna coklat kemerahan terbentuk pada antarmuka, maka menunjukkan adanya senyawa terpenoid (Irawan *et al.*, 2022). Namun, jika terbentuk cincin warna merah menunjukkan adanya steroid (Leswara & Kurniasih, 2024).

c. Uji kadar flavonoid total

Penentuan kadar flavonoid total ekstrak etanol 96% jahe hitam mengacu pada penelitian Wahyudi & Minarsih (2023) dengan modifikasi menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

1) Pembuatan larutan baku kuersetin (1000 ppm)

Kuersetin sejumlah 100,0 mg ditimbang lalu dilarutkan dalam etanol *p.a* ad 100 mL, kemudian digojog hingga homogen.

2) Penentuan *operating time* (OT) kuersetin

Penentuan OT menggunakan larutan baku kuersetin 40 ppm yang dibuat dari konsentrasi 1000 ppm. Diambil sejumlah 1 mL larutan baku 40 ppm kemudian ditempatkan pada labu takar 10 mL lalu ditambahkan *aluminum chloride* 10 % 1 mL dan asam asetat 5% hingga garis batas. Selanjutnya serapannya dibaca pada panjang gelombang optimum teoritis kuersetin yaitu 414 nm pada rentang 0-40 menit.

3) Penentuan panjang gelombang optimum kuersetin

Konsentrasi baku kuersetin yang digunakan pada penentuan ini adalah 40 ppm. Dari baku kuersetin 40 ppm diambil 1 mL dan ditambahkan *aluminum chloride* 10% 1 mL lalu ke dalamnya ditambahkan asam asetat 5% ad 10 mL. Selanjutnya diinkubasi pada ruangan gelap sesuai OT yang diperoleh. Larutan dibaca absorbansinya pada λ 350-500 nm.

4) Pembuatan kurva standar kuersetin

Dibuat lima seri konsentrasi dari larutan baku kuersetin 1000 ppm yaitu 40, 50, 60, 70, dan 80 ppm. Diambil 1 mL dari masing-masing larutan, lalu ditambahkan ke dalamnya masing-masing 1 mL *aluminum chloride* 10% dan asam asetat 5% ad 10 mL. Selanjutnya diinkubasi selama OT yang diperoleh dan dibaca absorbansinya pada λ optimum kuersetin.

5) Pembuatan larutan stok dan penentuan kadar flavonoid total ekstrak jahe hitam

Dibuat larutan stok ekstrak jahe hitam 10.000 ppm lalu diencerkan hingga konsentrasinya 1500 ppm. Dimasukkan 1 mL larutan konsentrasi 1500 ppm dalam labu takar 10 mL, lalu tambahkan 1 mL *aluminum chloride* 10% dan asam asetat 5% hingga tanda batas. Inkubasi larutan selama OT yang diperoleh dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang optimum.

d. Uji aktivitas antioksidan

1) Pembuatan larutan DPPH (50 ppm)

Sebanyak 5 mg DPPH ditimbang dan dimasukkan dalam labu takar berukuran 100 mL, lalu dilarutkan homogen menggunakan etanol *p.a* hingga mencapai tanda batas dan disimpan pada wadah yang tertutup rapat dan gelap atau dilapisi aluminium foil (Salikode *et al.*, 2024).

2) Penentuan *operating time* DPPH

2 mL larutan DPPH 50 ppm ditambahkan 2 mL etanol *p.a* lalu digojog homogen. Larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang teoritis DPPH 516 nm dengan rentang 0-60 menit (Oktaria & Marpaung, 2023).

3) Panjang gelombang maksimum DPPH

2 mL larutan DPPH 50 ppm ditambah dengan 2 mL etanol *p.a* lalu digojog homogen. Selanjutnya larutan diinkubasi pada suhu ruang yang terhindar dari cahaya selama OT yang diperoleh, kemudian dibaca panjang gelombang optimum pada rentang 400-800 nm (Oktaria & Marpaung, 2023).

4) Pembuatan larutan kontrol

Dicampur larutan DPPH 50 ppm dan etanol *p.a* masing-masing 2 mL kemudian digojog homogen. Lalu diinkubasi dalam ruangan yang gelap selama OT yang diperoleh dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang optimum DPPH (Salikode *et al.*, 2024).

5) Pembuatan larutan pembanding kuersetin

Dibuat larutan pembanding kuersetin konsentrasi 100 ppm dari larutan induk dengan cara mengambil 0,5 mL larutan dan ditambahkan etanol *p.a* hingga tanda 5 mL. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi larutan pembanding 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; dan 4,5 ppm dalam labu takar 10 mL.

6) Pengukuran larutan pembanding kuersetin

Larutan standar kuersetin diambil sejumlah 2 mL dari setiap konsentrasi, ditambahkan ke dalamnya sejumlah 2 mL DPPH 50 ppm lalu digojog homogen, kemudian diinkubasi pada suhu ruang berdasarkan OT

yang diperoleh. Dibaca absorbansinya pada panjang gelombang optimum DPPH (Oktaria & Marpaung, 2023).

7) Pembuatan larutan stok ekstrak jahe hitam (10.000 ppm)

Ditimbang 100 mg ekstrak lalu larutkan dalam etanol *p.a* hingga 10 mL, gojog homogen (10.000 ppm). Selanjutnya 5 seri konsentrasi larutan ekstrak, yang terdiri dari 150, 250, 350, 450, dan 550 ppm dibuat pada labu takar 10 mL.

8) Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak jahe hitam

Dari masing-masing seri konsentrasi larutan ekstrak diambil 2 mL, tambahkan 2 mL DPPH 50 ppm, lalu homogenkan dan diinkubasi sesuai OT yang diperoleh pada suhu ruang yang terhindar dari cahaya. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang optimum DPPH (Oktaria & Marpaung, 2023).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Dalam Winahyu *et al* (2019) kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol 96% rimpang *Kaempferia parviflora* dihitung dengan mengukur absorbansi sampel. Nilai absorbansi tersebut dimasukkan dalam persamaan garis regresi linier ($y = bx + a$) yang telah dihasilkan dari kurva baku standar. Dari persamaan tersebut dapat diperoleh konsentrasi sampel. Untuk menghitung kadar flavonoid dalam sampel digunakan rumus:

$$Kadar = \frac{CxVxFp}{W}$$

Keterangan:

C = Konsentrasi senyawa dalam larutan sampel

W = Berat Sampel

Fp = Faktor Pengenceran

V = Volume Sampel

2. Perhitungan *Inhibition Concentration* 50% (IC₅₀)

Aktivitas antioksidan sampel dapat ditentukan berdasarkan absorbansi radikal DPPH oleh sampel melalui perhitungan presentase inhibisi serapan.

Perhitungan % inhibisi dapat dihitung dengan rumus berikut (Agustiarini & Wijaya, 2022):

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol (DPPH)} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi kontrol (DPPH)}} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan dapat dihitung menggunakan regresi linier dengan persamaan regresi ($y = bx + a$). Sumbu x menunjukkan konsentrasi ekstrak dan sumbu y menunjukkan nilai % inhibisi (antioksidan). Persamaan ini kemudian digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} (*Inhibitory concentration 50*) setiap sampel dimana nilai y dinyatakan sebesar 50 dan nilai x yang diperoleh dinyatakan sebagai nilai IC_{50} . IC_{50} merupakan konsentrasi sampel yang dapat meredam atau menghambat sebesar 50% radikal DPPH (Agustiarini & Wijaya, 2022).

3. Analisis Data

Aktivitas antioksidan sampel diukur menggunakan spektrofotometer UV-Visibel. Data yang didapatkan kemudian disajikan dalam bentuk tabel. Kuersetin adalah pembanding yang digunakan sebagai kontrol. Selain itu, Nilai IC_{50} yang diperoleh dibandingkan dengan nilai IC_{50} secara teoritis yang disajikan pada **Tabel 2** (Agustiarini & Wijaya, 2022).

Tabel 2. Kategori Antioksidan Berdasarkan IC_{50} (Dewi *et al.*, 2022).

Aktivitas Antioksidan	Kategori (ppm)
Sangat Kuat	<50
Kuat	50-100
Sedang	100-150
Lemah	>150