

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Pengambilan dan Determinasi Sampel

Dalam penelitian ini sampel rimpang jahe hitam diambil pada bulan Mei 2024 dari Desa Caturtunggal, Kabupaten Sleman, Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta. Proses determinasi sampel dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Terapan Universitas Ahmad Dahlan dengan surat keterangan nomor 211/Lab.Bio/B/V/2024. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman tersebut adalah *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker dan dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

2. Preparasi Sampel dan Ekstraksi

Hasil penelitian menunjukkan persentase kadar air simplisia rimpang jahe hitam sebesar 0,53%. Setelah dilakukan proses ekstraksi didapatkan ekstrak kental berwarna coklat kehitaman dan memiliki bau khas jahe dengan bobot ekstrak yang diperoleh sejumlah 12,0678 gram.



Gambar 5. Ekstrak Kental Etanol 96% Rimpang Jahe Hitam
(Dokumentasi Pribadi)

Hasil rendemen ekstrak didapatkan dari persentase perbandingan bobot ekstrak kental yang diperoleh terhadap bobot serbuk rimpang jahe hitam. Hasil rendemen dan kadar air ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Rendemen Ekstrak Etanol 96% Jahe Hitam

Bobot Sampel (gram)	Bobot Ekstrak (gram)	Rendemen (%)	Kadar Air Ekstrak (%)
100,1	12,0678	12,0558	8,30

3. Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 96% Rimpang Jahe Hitam

Berdasarkan analisis kualitatif yang telah dilakukan pada sampel jahe hitam, maka didapatkan senyawa metabolit sekunder di dalam ekstrak jahe hitam yang disajikan pada **Tabel 4**.

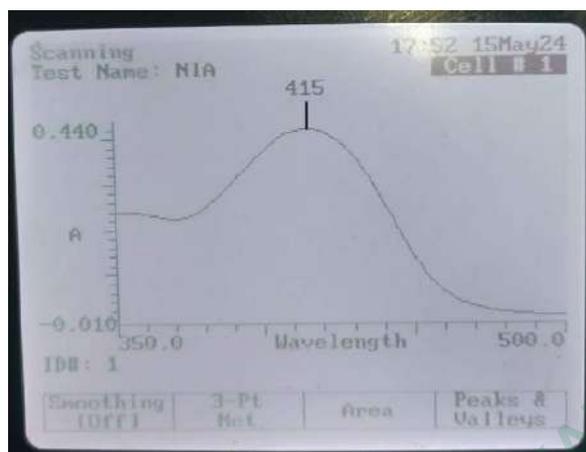
Tabel 4. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol 96% Jahe Hitam

Metabolit Sekunder	Metode Pengujian	Hasil	Keterangan Hasil Positif
Flavonoid	Mg + HCl	+	Perubahan warna menjadi merah
Fenolik	FeCl ₃ 5%	+	Perubahan warna menjadi hijau kehitaman
Tanin	FeCl ₃ 1%	+	Perubahan warna menjadi coklat kehitaman
	Gelatin 1% + NaCl 10%	+	Terbentuk endapan putih kekuningan
Alkaloid	Preaksi mayer		Terbentuk endapan kuning
	Preaksi dragendorff,	+	Terbentuk endapan jingga
	Preaksi bouchardat		Terbentuk endapan coklat
Steroid	Salkowski (Kloroform + H ₂ SO ₄)	+	Terbentuk cincin merah

4. Penetapan Kadar Flavonoid Total

a. Penentuan *operating time* dan panjang gelombang maksimum kuersetin

Pada penelitian ini penentuan *operating time* (OT) kuersetin dilakukan pada konsentrasi 40 ppm menggunakan panjang gelombang optimum teoritis yaitu 414 nm. Hasil *running* menunjukkan *operating time* dimulai pada menit ke 20 hingga 40 dan dapat dilihat pada **Lampiran 6**. Sedangkan pada pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan pada rentang OT 20 – 40 menit dengan *range* 350 – 500 nm dan diperoleh panjang gelombang maksimum 415 nm. Hasil ini dapat dilihat pada **Gambar 6**.



Gambar 6. Hasil Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

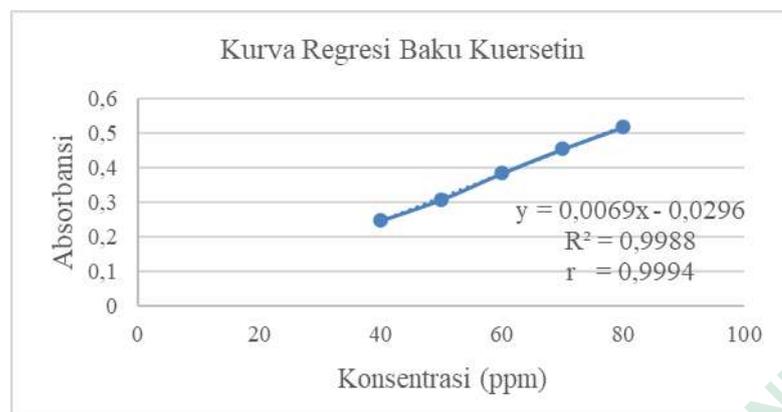
b. Pembuatan kurva standar

Pada penelitian ini kurva standar kuersetin didapatkan dari hasil *scanning* beberapa seri konsentrasi yang dibuat dari larutan induk kuersetin 1000 ppm diantaranya 40, 50, 60, 70, dan 80 ppm pada panjang gelombang 415 nm dan dibaca pada *range* OT 20 – 40 menit. Absorbansi yang diperoleh dari setiap seri konsentrasi dapat dilihat pada **Tabel 5**.

Tabel 5. Kurva Standar Kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
40	0,247
50	0,308
60	0,384
70	0,454
80	0,517

Berdasarkan data absorbansi dari seri konsentrasi kemudian akan diperoleh persamaan regresi linier antara konsentrasi dengan absorbansi $y = 0,0069 x - 0,0296$ dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9994. Nilai r hitung $>$ dari r tabel (0,8783) menunjukkan bahwa persamaan regresi yang diperoleh dinyatakan valid dan dapat dipergunakan untuk mencari kadar flavonoid total ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam. Gravig kurva regresi seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 7**.



Gambar 7. Kurva Regresi Standar Kuersetin

c. Penentuan kadar flavonoid ekstrak etanol 96% jahe hitam

Kadar flavonoid total ekstrak etanol 96% rimpang *Kaempferia parviflora* diuji menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis di panjang gelombang maksimum 415 nm serta diinkubasi sesuai waktu operasional yang diperoleh yaitu 20 – 40 menit. Kadar flavonoid total dihitung dengan kurva regresi yang telah didapatkan. Hasil pengujian menunjukkan kadar total flavonoid rata-rata sebesar 40,3348 mgQE/g ekstrak dengan nilai SD = 0,8957 dan nilai $\bar{x} \pm LE$ sebesar $40,3348 \pm 2,2252$ mgQE/g ekstrak. Hasil penetapan kadar ditunjukkan pada **Tabel 6**.

Tabel 6. Hasil Penetapan Kadar Flavonoid Total

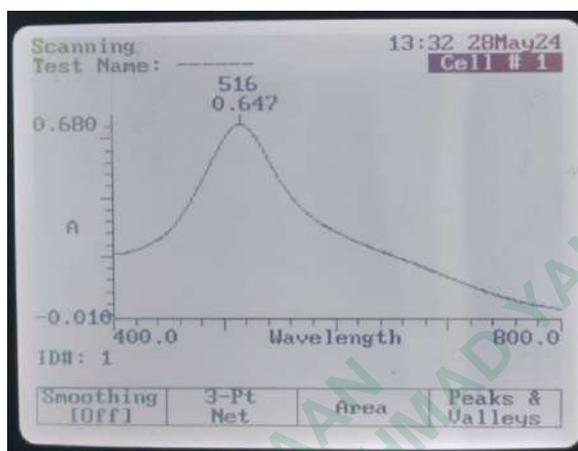
Berat Sampel (mg)	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Kadar Flavonoid Total (mgQE/g ekstrak)	Rata-rata Kadar (mgQE/g ekstrak)
99,9	1500	0,381	39,7065	40,3348
100,0		0,384	39,9335	
100,1		0,399	41,3588	
SD				0,8957
CV %				2,2206
LE				2,2252

5. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Penentuan *operating time* dan panjang gelombang maksimum DPPH

Penentuan *operating time* dilakukan pada panjang gelombang optimum teoritis DPPH yaitu 516 nm dan diperoleh waktu operasional untuk DPPH pada menit ke 43 – 47. Selanjutnya dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum DPPH pada *range* panjang gelombang 400

– 800 nm yang dibaca pada rentang OT 43 – 47 menit. Panjang gelombang maksimum DPPH 50 ppm yang diperoleh adalah 516 nm seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 8**.



Gambar 8. Hasil Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

b. Pengukuran aktivitas antioksidan standar

Uji aktivitas antioksidan larutan standar kuersetin diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 516 nm dan dibaca absorbansinya pada OT yaitu menit 43 – 47 serta dalam pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Setelah diperoleh konsentrasi dan absorbansi dihitung persen inhibisi yang digunakan untuk mencari nilai IC_{50} standar maupun sampel. Hasil persen inhibisi dapat dilihat pada **Tabel 7**. Selanjutnya dibuat kurva regresi antara konsentrasi standar vs % inhibisi yang dapat dilihat pada **Lampiran 13**. Persen inhibisi dapat diartikan sebagai besarnya kemampuan sampel dalam meredam radikal bebas, sedangkan nilai IC_{50} adalah konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% radikal DPPH.

Nilai IC_{50} dari standar kemudian ditentukan dengan mengganti nilai 50 di konstanta y pada persamaan regresi yang diperoleh. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh bahwa standar kuersetin menunjukkan aktivitas antioksidan sangat kuat dimana nilai rata-rata IC_{50} yang dihasilkan sebesar 4,098. Hasil perhitungan IC_{50} dapat dilihat pada **Tabel 7** dan **Lampiran 13**.

Tabel 7. Persen Inhibisi dan Nilai IC₅₀ Standar Kuersetin

No	% Inhibisi Standar Kuersetin					Persamaan Regresi Linier	IC ₅₀ (ppm)
	0,5 ppm	1,5 ppm	2,5 ppm	3,5 ppm	4,5 ppm		
1	10,819	25,811	36,012	45,595	53,941	$y = 10,603 x + 7,9286$ $r = 0,9932$	3,968
2	12,674	22,102	34,776	40,958	54,714	$y = 10,294 x + 7,3108$ $r = 0,9952$	4,147
3	14,374	26,121	34,003	43,895	52,550	$y = 9,4127 x + 10,6571$ $r = 0,9982$	4,180
Rata-rata ± LE							4,098± 0,283
SD							0,114
CV (%)							2,784

c. Pengukuran aktivitas antioksidan sampel

Uji aktivitas antioksidan sampel diukur absorbansinya seperti pada pengukuran standar serta pengujiannya dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Setelah diperoleh nilai absorbansi dibuat kurva regresi antara konsentrasi dengan % inhibisi. Hasil perhitungan % inhibisi dan IC₅₀ ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam ditunjukkan pada **Tabel 8** dan **Lampiran 15 dan 16**. Nilai rata-rata IC₅₀ ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam sebesar 530,567 ppm yang dikategorikan sebagai antioksidan sangat lemah.

Tabel 8. Persen Inhibisi dan Nilai IC₅₀ Sampel Rimpang Jahe Hitam

No	% Inhibisi Sampel Rimpang Jahe Hitam					Persamaan Regresi Linier	IC ₅₀ (ppm)
	150 ppm	250 ppm	350 ppm	350 ppm	450 ppm		
1	14,838	23,957	32,457	42,813	51,777	$y = 0,0927 x + 0,7115$ $r = 0,9996$	531,699
2	14,065	23,338	32,303	42,195	50,696	$y = 0,0921 x + 0,2777$ $r = 0,9998$	539,873
3	18,083	25,811	34,158	43,277	53,478	$y = 0,0883 x + 4,0726$ $r = 0,9985$	520,129
Rata-rata ± LE							530,567 ± 24,640
SD							9,918
CV (%)							1,869

B. Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar flavonoid total dan uji peredaman radikal bebas dengan metode DPPH dari ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora*) untuk mengetahui kadar flavonoid total, aktivitas antioksidan, dan kandungan senyawa aktif yang terkandung di dalamnya. Dalam penelitian ini tanaman jahe hitam yang diperoleh terlebih dahulu di

determinasi untuk mendapatkan secara pasti kebenaran identitas tanaman yang akan diuji.

Sampel yang sudah dideterminasi dikumpulkan lalu dibersihkan dengan air mengalir dan di rajang menjadi bagian-bagian kecil bertujuan untuk mempercepat proses pengeringan. Selanjutnya sampel di keringkan dalam oven diatur pada suhu 50°C selama 48 jam, proses ini ditujukan untuk menurunkan kadar air sampel agar tidak mudah rusak akibat mikroorganismenya seperti bakteri dan kapang. Hasil penelitian menunjukkan persentase kadar air simplisia rimpang jahe hitam sebesar 0,53%, hal ini sudah memenuhi syarat kadar air kurang dari 10% (Kemenkes RI, 2017). Sampel kering kemudian dihaluskan menjadi serbuk dengan menggunakan grinder lalu diayak dengan mesh No 60. Tujuan sampel dibuat serbuk karena dengan ukuran partikel yang semakin kecil kontak antara partikel sampel dengan pelarut lebih besar dan luas, selain itu jarak difusi solut semakin pendek sehingga kecepatan ekstraksi lebih besar, sedangkan tujuan dari pengayakan adalah untuk membuat ukuran serbuk simplisia yang digunakan menjadi seragam (Asworo & Widwastuti, 2023; Jayani & Handojo, 2018). Proses ekstraksi menjadi lebih efektif jika serbuk simplisia semakin halus, namun jika ukuran partikel simplisia terlalu kecil, ekstrak dapat mengandung banyak zat pengotor (Illing *et al.*, 2023).

Untuk menarik senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid yang terdapat dalam sampel rimpang jahe hitam dilakukan dengan proses ekstraksi salah satunya adalah maserasi. Metode maserasi didasarkan pada proses pembelahan dinding sel dan membran sel karena adanya perbedaan tekanan antara bagian dalam dan luar sel simplisia. Hal ini menyebabkan senyawa aktif dalam sitoplasma sel dapat larut dalam pelarut yang digunakan (Handoyo, 2020). Proses maserasi dilakukan dengan mencampur simplisia rimpang jahe hitam dengan pelarut etanol 96% lalu didiamkan pada suhu ruang selama 48 jam dan terhindar dari cahaya dengan dilakukan pengadukan yang bertujuan untuk mempercepat reaksi antara pelarut dengan zat aktif yang ada dalam sampel.

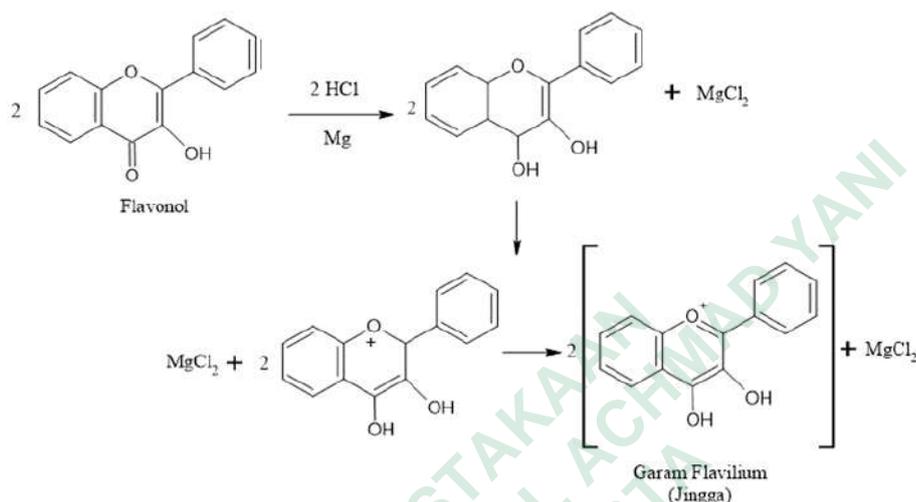
Pemilihan pelarut yang tepat dalam proses maserasi sangat penting guna meningkatkan efektivitasnya, terutama jika memperhatikan kelarutan atau polaritas senyawa aktif yang terdapat dalam bahan alam (Handoyo, 2020). Flavonoid

termasuk senyawa polar dalam kelompok polifenol dan dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol karena memiliki gugus hidroksil (-OH) (Asih *et al.*, 2022). Hal tersebut yang menjadi alasan pada penelitian ini digunakan pelarut etanol 96% untuk maserasi. Selain itu pemilihan etanol didasarkan pada tingkat kemudahan penguapan, keamanan, dan kemampuannya melarutkan hampir semua jenis zat, baik bersifat polar, semi polar, maupun nonpolar. Etanol juga efektif menarik senyawa flavonoid secara optimal sehingga harapannya sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam rimpang jahe hitam dapat terekstrak oleh etanol (Illing *et al.*, 2023). Pelarut etanol 96% dengan kadar air hanya sebesar 4% lebih efektif dalam mengurangi kontaminasi dan pertumbuhan mikroorganisme pada ekstrak (Colvin, 2018). Pada penelitian ini pemilihan waktu maserasi mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Leswara & Kurniasih (2024) yang menyatakan bahwa waktu maserasi optimum untuk menghasilkan kadar flavonoid total pada rimpang jahe hitam adalah 48 jam. Untuk menarik sisa-sisa senyawa yang mungkin masih ada pada saat maserasi maka pada penelitian ini dilakukan proses remaserasi selama 24 jam.

Selanjutnya pada penelitian ini dilakukan proses penguapan filtrat hingga menjadi ekstrak kental pada suhu 50°C, hal tersebut bertujuan agar senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak tidak mengalami kerusakan selama proses penyarian (Sogandi & Rabima, 2019). Hasil maserasi ekstrak kental rimpang jahe hitam diperoleh sebanyak 12,0678 gram dengan karakteristik ekstrak berwarna coklat kehitaman dan memiliki bau jahe yang khas. Persen rendemen yang diperoleh sebesar 12,0558% dengan kadar air 8,30%. Proses ekstraksi yang dilakukan efektif karena rendemen yang dihasilkan lebih dari 10% (Wowor *et al.*, 2022). Nilai rendemen yang tinggi menandakan semakin banyak zat aktif yang terdapat dalam sampel (Pawarti *et al.*, 2023). Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi nilai rendemen diantaranya ukuran partikel, polaritas pelarut, waktu ekstraksi, dan konsentrasi pelarut yang digunakan (Handoyo, 2020).

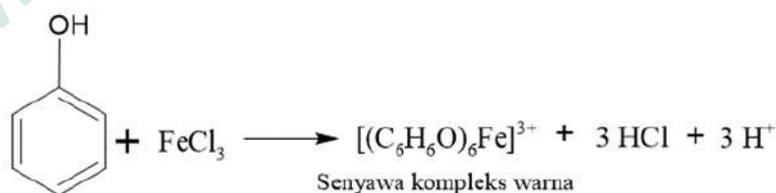
Setelah diperoleh ekstrak kental, langkah selanjutnya adalah uji kualitatif untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder dalam rimpang jahe hitam dengan uji tabung. Dalam pengujian senyawa flavonoid, dilakukan penambahan HCl dan

serbuk Mg dengan tujuan mereduksi inti benzopiron pada struktur flavonoid. Hal ini menyebabkan terjadinya perubahan warna menjadi merah atau jingga yang menandakan terbentuknya garam flavilium (Wowor *et al.*, 2022). Reaksi pembentukan garam flavilium dapat dilihat pada **Gambar 9**.



Gambar 9. Reaksi Flavonoid dengan Mg + HCl Membentuk Garam Flavilium (Sari *et al.*, 2022)

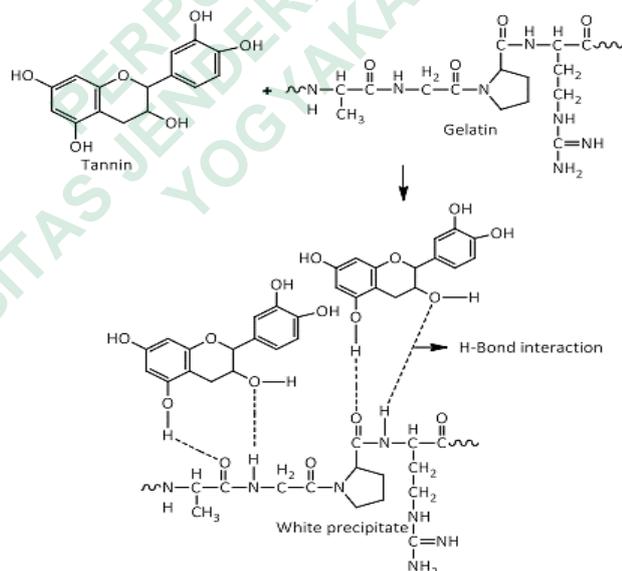
Pada uji senyawa fenolik terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman pada sampel yang menandakan hasil positif mengandung fenolik. Pereaksi FeCl₃ 5% yang ditambahkan akan bereaksi dengan gugus -OH aromatis yang ada pada senyawa fenol (Estikawati & Lindawati, 2019). Menurut Mukhriani *et al.*, (2019), ion Fe³⁺ akan membentuk kompleks dengan fenol sehingga menyebabkan perubahan warna. Reaksi antara fenol dengan FeCl₃ tersajikan pada **Gambar 10**.



Gambar 10. Reaksi Senyawa Fenol dengan FeCl₃ (Mukhriani *et al.*, 2019)

Pada uji senyawa tanin dilakukan dengan dua cara yaitu dengan menambahkan pereaksi FeCl₃ 1% dan menggunakan pereaksi gelatin 1%. Uji kualitatif dengan pereaksi FeCl₃ dapat mengidentifikasi adanya gugus fenol. Jika senyawa fenol terdeteksi, kemungkinan besar juga terdapat senyawa tanin, karena tanin merupakan senyawa polifenol (Ikalinus *et al.*, 2015). Pada pereaksi FeCl₃

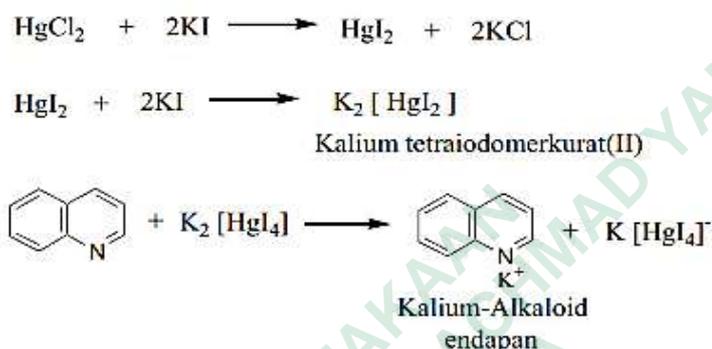
perubahan warna coklat kehitaman terjadi karena terbentuknya kompleks senyawa tanin dengan FeCl_3 . Untuk memperkuat dugaan terdapatnya tanin pada ekstrak jahe hitam perlu dilakukan pengujian menggunakan gelatin. Prinsip dasar dari uji tanin dengan menggunakan gelatin yaitu kemampuan tanin dalam berikatan dengan protein, sehingga ketika tanin bereaksi dengan gelatin (yang merupakan protein) maka akan terbentuk endapan (Sari *et al.*, 2019). Pembentukan endapan putih menandakan adanya senyawa tanin karena adanya ikatan hidrogen antara tanin dan gelatin yang dapat dilihat pada **Gambar 11**. Pada struktur gelatin, atom hidrogen dari gugus hidroksil tanin membentuk ikatan hidrogen dengan atom O dan N, sedangkan penambahan NaCl dimaksudkan untuk meningkatkan penggaraman tanin dan gelatin (Erlidawati *et al.*, 2023). Pada penelitian ini positif tanin karena terbentuk endapan berwarna putih kekuningan dan pada penelitian yang dilakukan oleh Ikalinus *et al* (2015) hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan kekuningan.



Gambar 11. Reaksi Pembentukan Endapan Putih dari Tanin dengan Gelatin (Erlidawati *et al.*, 2023)

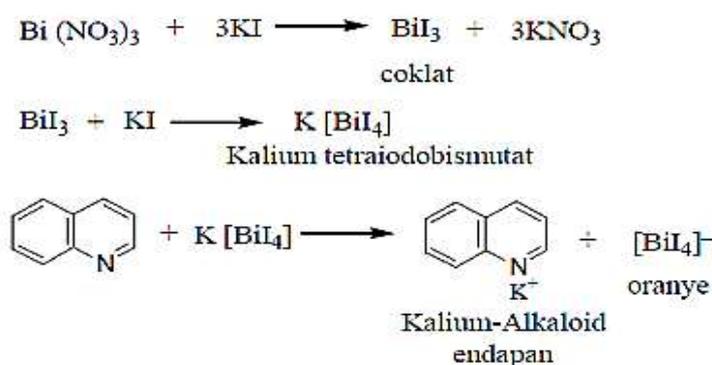
Pada uji alkaloid digunakan pereaksi mayer, dragendorf, dan bouchardat. Hasil penelitian menunjukkan hasil positif menggunakan ketiga pereaksi. Senyawa alkaloid mengandung atom nitrogen dan bersifat basa sehingga diperlukan asam klorida untuk mengekstraknya (Sulistyarini *et al.*, 2020). Hasil positif pada

penambahan pereaksi mayer yaitu terbentuknya endapan berwarna putih hingga kekuningan yang disebabkan oleh gugus nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) yang merupakan hasil reaksi pada saat pembuatan reagen mayer dengan penambahan KI berlebih ($K_2[HgI_2]$) sehingga akan membentuk kompleks kalium alkaloid (Syahadat & Siregar, 2020). Reaksi tersebut ditunjukkan pada **Gambar 12**.



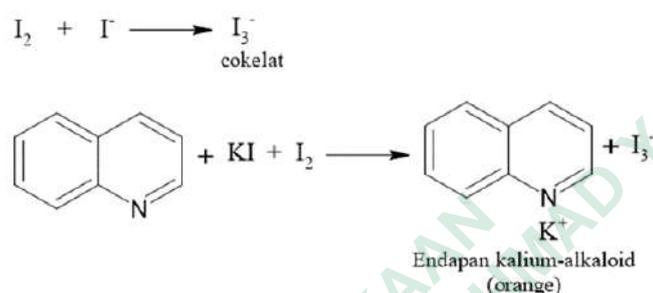
Gambar 12. Reaksi Senyawa Alkaloid dengan Pereaksi Mayer (Yasser *et al.*, 2022)

Hasil positif pada pereaksi dragendorff terjadi karena adanya pembentukan kompleks antara kalium alkaloid berupa kalium iodida (KI) dengan ion tetraiodobismutat. Pereaksi dragendorff dibuat berdasarkan pembentukan kalium tetraiodobismutat ($K[BiI_4]$) yang merupakan hasil dari reaksi bismuth nitrat ($Bi(NO_3)_3$) dengan kalium iodida (KI) berlebih. Ion logam K^+ dari kalium tetraiodobismutat ($K[BiI_4]$) akan bereaksi dengan gugus nitrogen yang terdapat pada alkaloid untuk membentuk ikatan kovalen koordinat seperti yang terlihat pada **Gambar 13** sehingga memberikan endapan berwarna jingga (Syahadat & Siregar, 2020),.



Gambar 13. Reaksi Senyawa Alkaloid dengan Pereaksi Dragendorff (Zaini & Shofia, 2020)

Terbentuknya endapan coklat kehitaman menandakan hasil positif pada pereaksi bouchardat. Pereaksi bouchardat di dalamnya terdapat kalium iodida dan iod. Dengan adanya ikatan kovalen koordinasi antara ion logam K^+ dengan alkaloid yang menghasilkan endapan coklat kompleks kalium alkaloid (Sulistyarini *et al.*, 2020). Reaksi ini dapat dilihat pada **Gambar 14**.

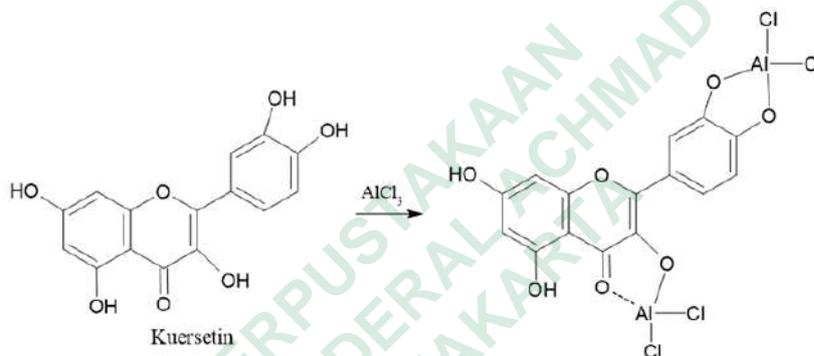


Gambar 14. Reaksi Senyawa Alkaloid dengan Pereaksi Bouchardat (Parbuntari *et al.*, 2018)

Selanjutnya adalah uji steroid dilakukan dengan penambahan kloroform dan H_2SO_4 , dimana H_2SO_4 berfungsi untuk memutus ikatan ester lipid yang ada pada sampel. Hasil menunjukkan bahwa terdapat cincin berwarna merah, ini sejalan dengan penelitian Leswara & Kurniasih (2024), ekstrak etanol 70% rimpang jahe hitam positif mengandung steroid yang ditandai dengan terbentuknya cincin berwarna merah. Berdasarkan skrining fitokimia pada ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora*) terdapat kandungan metabolit sekunder berupa flavonoid, fenolik, tanin, alkaloid, dan steroid.

Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Metode tersebut digunakan karena dalam senyawa flavonoid terdapat gugus kromofor dan auksokrom. Gugus auksokrom adalah gugus fungsi yang memiliki pasangan elektron bebas, sementara gugus kromofor yaitu struktur yang memiliki ikatan rangkap konjugasi dan bertanggung jawab pada proses penyerapan energi elektromagnetik. Penyerapan pada panjang gelombang UV dan Visibel pada flavonoid terjadi karena keberadaan gugus kromofor dan auksokrom (Krisdiyanto & Saad, 2023).

Penetapan kadar flavonoid total ekstrak rimpang jahe hitam dilakukan dengan metode kolorimetri menggunakan standar kuersetin. Metode ini dilakukan dengan adanya penambahan AlCl_3 dan asam asetat. Penambahan AlCl_3 menyebabkan pembentukan kompleks berwarna pada senyawa flavonoid karena AlCl_3 akan bereaksi dengan gugus hidroksil C-3 atau C-5, gugus keton pada C-4 serta gugus ortohidroksi pada cincin B, akibatnya terjadi pergeseran panjang gelombang menuju daerah visibel (Krisdiyanto & Saad, 2023). Sedangkan penambahan asam (HCl) bertujuan agar mempertahankan serapan pada daerah visibel (Oktaria & Marpaung, 2023).



Gambar 15. Reaksi Pembentukan Kompleks Kuersetin dengan AlCl_3
(Winahyu *et al.*, 2019)

Salah satu contoh senyawa flavonoid adalah kuersetin dan dijadikan sebagai standar pada penelitian ini. Kuersetin dipilih sebagai standar karena senyawa tersebut memiliki distribusi sangat luas di dalam tumbuhan. Selain itu kuersetin dan glikosidanya berada dalam jumlah sekitar 60 – 75 % dari flavonoid dan juga termasuk dalam golongan flavonoid yang dapat membentuk kompleks dengan AlCl_3 (Winahyu *et al.*, 2019). Adapun menurut Lindawati & Ma'ruf (2020) serta Suharyanto & Prima (2020) pemilihan standar kuersetin dikarenakan merupakan senyawa flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada C-4 dan hidroksil pada C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol sehingga dapat membentuk kompleks dengan aluminium klorida ditandai dengan terbentuknya warna kuning pada larutan.

Pada penetapan kadar flavonoid terlebih dahulu dilakukan penentuan *operating time* dari standar kuersetin yang diikuti dengan penentuan panjang gelombang maksimum standar kuersetin. Penentuan *operating time* bertujuan untuk

mengetahui waktu pengukuran ketika absorbansi mencapai kestabilan maksimal, dimana reaksi antara sebuah senyawa telah mencapai kestabilan, hal ini untuk meminimalkan kesalahan dalam pengukuran (Suharyanto & Prima, 2020). *Operating time* kuersetin didapatkan pada menit ke 20 hingga 40, dimana pada *range* waktu tersebut kuersetin bereaksi dengan AlCl_3 hingga menghasilkan kompleks kuersetin yang stabil. Pada penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi *et al* (2022) *operating time* kuersetin yang dihasilkan pada menit ke 26.

Penentuan panjang gelombang optimum dilakukan untuk mengetahui panjang gelombang pengukuran ketika terjadinya kompleks kuersetin – AlCl_3 yang memberikan serapan optimum. Pengukuran pada panjang gelombang maksimum dapat menghasilkan perubahan absorbansi paling besar untuk setiap satuan kadar, hal ini akan meminimalkan terjadinya kesalahan pengukuran jika dilakukan replikasi dan pengukuran ulang (Suharyanto & Prima, 2020). Panjang gelombang maksimum kuersetin yang diperoleh yaitu 415 nm dan termasuk dalam daerah visibel (cahaya tampak). Panjang gelombang maksimum yang diperoleh hampir sama dengan panjang gelombang maksimum teoritis yaitu 414 nm (Winahyu *et al.*, 2019). Menurut Prananta *et al* (2020) panjang gelombang hasil pengamatan dapat bergeser antara 0 hingga 4 nm dari teoritisnya sehingga perbedaan tersebut dapat diterima.

Langkah berikutnya adalah membuat kurva standar dengan tujuan untuk melihat hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi larutan sehingga didapatkan kadar flavonoid sampel melalui persamaan kurva standar (Suharyanto & Prima, 2020). Kuersetin digunakan sebagai standar dalam penentuan kurva baku dengan beberapa seri konsentrasi yaitu 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; dan 4,5 ppm. Semakin tinggi konsentrasi standar kuersetin, semakin meningkat nilai absorbansi yang diperoleh. Pemilihan konsentrasi didasarkan pada hukum *Lambert-Beer* yang menyatakan syarat absorbansi berada di rentang 0,2 hingga 0,8. Kurva baku yang dihasilkan akan berbentuk garis lurus apabila hukum *Lambert-Beer* terpenuhi (Grace *et al.*, 2015). Dari data serapan yang diperoleh dapat diketahui nilai regresi linier yaitu $y = 0,0069 x - 0,0296$ dengan nilai koefisien korelasi (r) 0,9994. Nilai r

hitung yang mendekati 1 menunjukkan bahwa terdapat hubungan linier antara konsentrasi dengan nilai absorbansi pada kurva regresi.

Pengukuran kadar flavonoid total ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam diperlakukan sama seperti standar yaitu pengukuran dilakukan pada panjang gelombang maksimum 415 nm dengan *operating time* pada menit ke-20 hingga 40. Kadar flavonoid total ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam rata-rata sebesar 40,3348 mgQE/g ekstrak dengan koefisien variasi sebesar 2,2206 % dan nilai $\bar{x} \pm LE = 40,3348 \pm 2,2252$ mgQE/g ekstrak. Pada penelitian yang dilakukan oleh Leswara & Kurniasih (2024) diperoleh kadar flavonoid total ekstrak etanol 70% rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora*) sebesar 10,6161 mgQE/g ekstrak. Hasil yang diperoleh berbeda disebabkan karena pelarut yang digunakan berbeda, dimana sampel dengan pelarut etanol 96% memiliki kadar flavonoid total yang lebih tinggi dibandingkan menggunakan etanol 70%. Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam sampel rimpang jahe hitam terdapat kandungan senyawa flavonoid yang dapat berperan sebagai antioksidan untuk menangkal radikal bebas.

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antioksidan larutan standar kuersetin dan ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam dengan metode DPPH. Larutan sampel diuji menggunakan metode DPPH karena efektif dan mudah dikerjakan, serta dapat menunjukkan potensi dari suatu sampel dengan prinsip mendonorkan satu atom hidrogen kepada radikal bebas yang menyebabkan DPPH mengalami reduksi dan berubah menjadi senyawa DPPH non-radikal. Perubahan ini ditandai dengan berkurangnya warna ungu pada larutan DPPH disertai penurunan absorbansi (Salikode *et al.*, 2024).

Digunakan kuersetin menjadi larutan standar untuk penentuan aktivitas antioksidan dikarenakan kuersetin merupakan senyawa turunan flavonoid yang mempunyai khasiat bagi kesehatan seperti antiinflamasi, antivirus, antikanker, antibakteri, serta antioksidan sangat kuat (Widyasari *et al.*, 2019). Kuersetin memiliki kemampuan sebagai antioksidan karena memiliki gugus katekol di cincin B dan 3 gugus-OH di cincin A dan C yang mampu menangkap radikal bebas (Khayatik, 2017).

Pada penelitian ini penentuan aktivitas antioksidan dimulai dengan penentuan *operating time* dan panjang gelombang optimum. *Operating time* adalah waktu yang dibutuhkan antara senyawa antioksidan dengan radikal bebas untuk bereaksi sepenuhnya. Pengukuran serapan sampel pada saat *operating time* akan memastikan kestabilan nilai serapan selama proses pengujian (Isnindar & Luliana, 2020). Berdasarkan hasil penelitian absorbansi DPPH stabil pada menit ke 43 sampai 47. Pengukuran panjang gelombang optimum DPPH bertujuan untuk memperoleh panjang gelombang dimana senyawa yang diuji menghasilkan serapan maksimum dan perubahan warna pada senyawa telah optimum sehingga diperoleh kepekaan yang maksimal (Rastuti & Purwati, 2012). Dari data yang diperoleh serapan maksimum DPPH pada panjang gelombang 516 nm sesuai dengan panjang gelombang teoritisnya yaitu 516 nm (Oktaria & Marpaung, 2023). Selanjutnya dilakukan pembacaan absorbansi pada larutan kontrol untuk mengetahui absorbansi awal DPPH sebelum penambahan standar maupun sampel, serta absorbansinya digunakan dalam menghitung persen inhibisi pada standar maupun sampel (Muliasari *et al.*, 2023). Setelah dilakukan perhitungan persen inhibisi pada standar dibuat regresi antara konsentrasi dengan persen inhibisi sehingga diperoleh persamaan untuk menghitung nilai IC_{50} pada standar. Diperoleh hasil rata-rata IC_{50} pada standar yaitu 4,098 ppm (**Tabel 7**), hasil tersebut menunjukkan kuersetin termasuk kategori antioksidan sangat kuat. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Oktaria & Marpaung (2023) dengan menggunakan DPPH konsentrasi 50 ppm diperoleh hasil bahwa standar kuersetin memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} 4,16 ppm. Standar deviasi yang diperoleh lebih rendah dibandingkan nilai rata-rata IC_{50} yaitu 0,114 ini menunjukkan bahwa persebaran data yang rendah sehingga dapat dikatakan pengukuran yang dilakukan akurat (Muliasari *et al.*, 2023).

Selanjutnya dilakukan penentuan aktivitas antioksidan pada sampel. Absorbansi yang diperoleh semakin menurun disertai dengan semakin meningkatnya konsentrasi, hal ini terjadi dikarenakan DPPH bereaksi dengan senyawa antioksidan yang ada dalam sampel, dimana larutan uji sampel rimpang jahe hitam akan memberikan atom hidrogennya ke pada radikal bebas DPPH yang

akan menyebabkan penurunan nilai absorbansi. Selanjutnya dihitung persen inhibisi dari setiap konsentrasi lalu di buat regresi linier hingga diperoleh persamaan untuk menghitung nilai IC_{50} dari sampel. Penentuan nilai IC_{50} pada sampel dilakukan untuk mengetahui jumlah konsentrasi ekstrak yang diperlukan untuk menurunkan intensitas serapan radikal bebas DPPH sebesar 50% dibandingkan dengan standar. Semakin rendah IC_{50} yang diperoleh, menunjukkan semakin kuat aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh sampel tersebut. Pengukuran peredaman radikal bebas DPPH dari ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam diperoleh hasil rata-rata IC_{50} sebesar 530,567 ppm (**Tabel 8**). Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah. Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Julianti *et al* (2022) dengan pelarut etanol 96% terhadap radikal bebas DPPH diperoleh IC_{50} sebesar 547,202 ppm, sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Mishra & Sharma (2021) ekstrak etanol rimpang jahe hitam dari india diperoleh aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan IC_{50} sebesar 34,69 ppm dengan kadar flavonoid total sebesar 1,237 mgEQ/100 mg ekstrak kering (12,37 mg/g ekstrak kering). Lemahnya aktivitas antioksidan pada penelitian ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti perbedaan tempat tumbuh tanaman, konsentrasi pelarut, dan suhu penguapan atau pengeringan sampel. Pada penelitian Mishra & Sharma (2021), suhu penguapan yang digunakan lebih rendah yaitu 40°C sehingga kandungan flavonoid pada sampel minim terdegradasi. Selain itu dilakukan proses penghilangan lemak pada sampel sebelum dilakukan ekstraksi. Lemak memiliki sifat non polar sehingga dapat ditarik oleh pelarut etanol 96% yang bersifat semi polar, dimana etanol 96% dapat menarik senyawa polar maupun non polar. Dengan dilakukan proses penghilangan lemak dalam sampel, maka dapat memaksimalkan proses ekstraksi. Pada perhitungan antioksidan sampel memiliki standar deviasi lebih rendah dibandingkan rata-rata nilai IC_{50} yaitu 9,918, hal ini menandakan rendahnya persebaran data sehingga dapat dikatakan pengukuran yang dilakukan akurat (Muliasari *et al.*, 2023). Perhitungan nilai koefisien variasi dilakukan untuk menilai konsistensi hasil analisis yang diperoleh dari sampel homogen yang diambil secara acak berulang

(Suharyanto & Prima, 2020). Syarat nilai % koefisien variasi yang baik adalah $<2\%$ (Muslich *et al.*, 2020). Diperoleh koefisien variasi sebesar $1,8694\%$ hal ini memenuhi syarat yang dapat diartikan data yang diperoleh homogen.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
PERPUSTAKAAN
YOGYAKARTA