

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Hasil

#### 1. Pengambilan Sampel dan Determinasi Tanaman

Rimpang jahe hitam didapatkan dari Catur Tunggal Depok, Kabupaten Sleman, Yogyakarta. Sampel yang telah diperoleh kemudian dilakukan determinasi di Laboratorium Pembelajaran Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta pada tanggal 24 April 2024 dengan nomor pada surat keterangan 211/Lab.Bio/B/V/2024. Hasil dari determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan sudah benar yaitu *Kaempferia parviflora* wall ex baker, termasuk dalam keluarga Zingiberaceae. Hasil determinasi tanaman dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

#### 2. Persiapan Sampel dan Ekstraksi

Sampel rimpang jahe hitam yang telah diperoleh lalu dikeringkan, dihaluskan, dan diayak dengan ayakan 60 mesh, kemudian sampel ditimbang untuk melanjutkan pada proses ekstraksi. Ekstrak kental yang telah diperoleh kemudian ditimbang dan dihitung nilai rendemennya. Nilai rendemen yang didapatkan sudah memenuhi persyaratan yang baik yaitu lebih dari 10% (Kemenkes RI, 2017). Hasil rendemen dapat dilihat pada **Tabel 3**.

**Tabel 3. Hasil Perhitungan Rendemen Ekstrak Jahe Hitam**

Sampel	Kadar air simplisia (%)	Berat sampel (gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Rimpang jahe hitam	0,53	100,0	17,4047	17,4047

#### 3. Uji Organoleptik

Dari pengujian yang telah dilakukan pada sampel ekstrak jahe hitam didapatkan sifat fisik dari sampel yang dapat dilihat pada **Tabel 4**.

**Tabel 4. Uji Organoleptik Ekstrak Etanol 96% Rimpang Jahe Hitam**

Uji	Hasil
Warna	Cokelat pekat
Bau	Khas
Tekstur	Kental

#### 4. Skrining Fitokimia

Berdasarkan penelitian maka diperoleh hasil skrining fitokimia yaitu pada senyawa flavonoid, fenolik, alkaloid, tanin, dan saponin dari sampel ekstrak rimpang jahe hitam yang dapat dilihat pada **Tabel 5**, dan untuk gambar hasil pengujian dapat dilihat pada **Lampiran 6**.

**Tabel 5. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 96% Rimpang Jahe Hitam**

Metabolit sekunder	Pereaksi	Hasil teoritis	Hasil penelitian
Flavonoid	Magnesium + HCl pekat	Warna kuning hingga merah	Positif (+)
Fenolik	FeCl <sub>3</sub> 5% HCl 2 N + Wagner	Hijau kehitaman Endapan warna coklat kehitaman	Positif (+)
Alkaloid	HCl 2 N + Mayer HCl 2 N + Dragendoff	Endapan warna kuning Endapan warna jingga	Positif (+)
Tanin	Gelatin 1% + NaCl 10%	Endapan warna putih kekuningan	Positif (+)
Saponin	<i>Aquadest</i>	Timbul busa	Negatif (-)

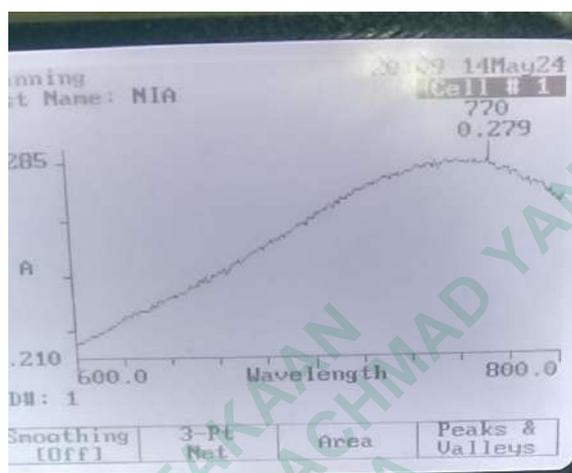
Berdasarkan hasil pada **Tabel 5** dapat diketahui bahwa sampel ekstrak etanol 96% jahe hitam positif mengandung senyawa flavonoid, fenolik, alkaloid, dan tanin. Sedangkan pada uji saponin menunjukkan hasil yang negatif.

#### 5. Penetapan Kadar Fenolik Total

- a. Penentuan *operating time* dan panjang gelombang optimum asam galat

Langkah awal yang dilakukan adalah membuat induk dari standar asam galat pada konsentrasi 1000 ppm dan 100 ppm. Selanjutnya mencari *operating time* dan panjang gelombang maksimum dengan standar asam galat pada konsentrasi 30 ppm. Hasil penelitian ini diperoleh *operating time* yang dimulai dari menit

ke-54 sampai menit ke-60 yang disajikan pada **Lampiran 12**. Sedangkan untuk panjang gelombang optimum diperoleh sebesar 770 nm dengan absorbansi sebesar 0,279 yang dapat dilihat pada **Gambar 7**.



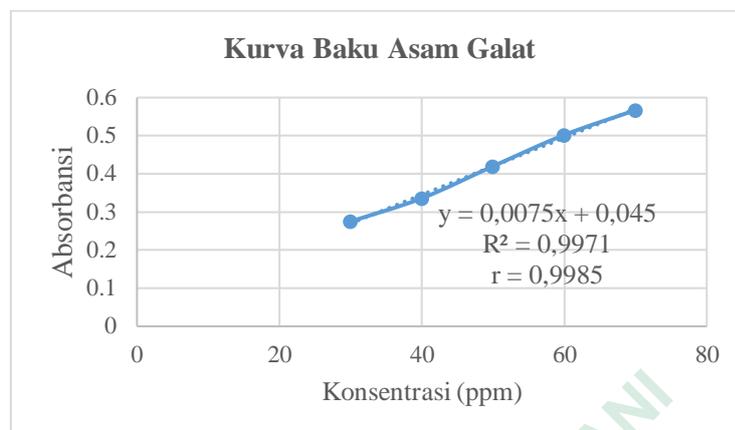
**Gambar 7. Panjang Gelombang Maksimum Standar Asam Galat**

b. Penentuan kurva baku asam galat

Penentuan kurva baku standar asam galat bertujuan untuk mendapatkan persamaan regresi linier yang akan digunakan untuk menentukan kadar fenolik pada sampel. Kurva baku dibuat menggunakan standar asam galat konsentrasi 100 ppm, kemudian diencerkan menjadi beberapa seri konsentrasi. Hasil pengukuran absorbansi seri konsentrasi dari larutan standar asam galat dapat dilihat pada **Tabel 6**, sedangkan untuk grafik kurva baku asam galat dapat dilihat pada **Gambar 8**.

**Tabel 6. Absorbansi Kurva Baku Asam Galat**

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
30	0,275
40	0,336
50	0,420
60	0,502
70	0,567



**Gambar 8. Kurva Baku Asam Galat**

Berdasarkan kurva baku asam galat, diperoleh persamaan regresi linier antara konsentrasi dengan absorbansi, yaitu  $y = 0,0075x + 0,045$  dengan nilai  $r$  hitung  $0,9985 > r$  tabel  $0,8783$ . Apabila dilihat dari hasil regresi tersebut, maka dapat dikatakan linier karena nilai  $r$  mendekati 1.

c. Penentuan kadar fenolik pada sampel

Penentuan kadar fenolik bertujuan untuk mengetahui total senyawa fenolik dalam sampel ekstrak jahe hitam. Langkah awal yang dilakukan ialah membuat larutan induk sampel dengan konsentrasi 10.000 ppm kemudian diencerkan menjadi 4000 ppm. Berdasarkan penelitian dan perhitungan yang telah dilakukan, maka diperoleh kadar total fenolik dalam sampel yaitu sebesar  $15,8667 \pm 0,1562$  mgGAE/g ekstrak. Hasil perhitungan kadar total fenolik dapat dilihat pada **Tabel 7**.

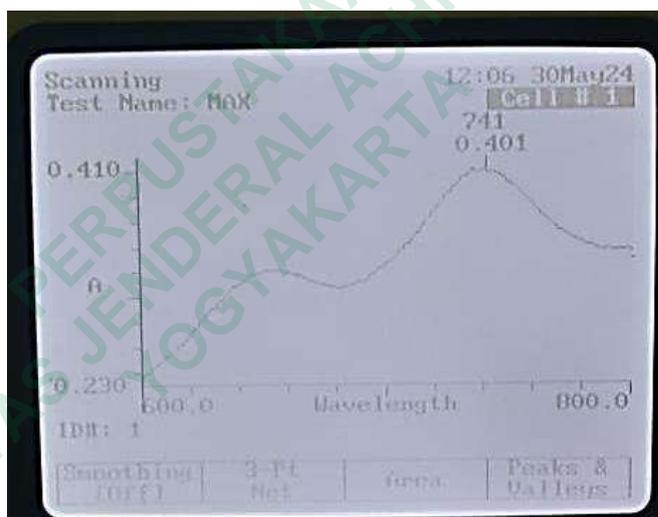
**Tabel 7. Kadar Total Fenolik Ekstrak Etanol 96% Rimpang Jahe Hitam**

Replikasi	Bobot sampel (mg)	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi sampel	Fenolik total (mgGAE/g ekstrak)
1	100,0	4000	0,519	15,8
2			0,521	15,875
3			0,523	15,925
$\bar{x} \pm LE$ (mgGAE/g ekstrak)				$15,8667 \pm 0,1562$
SD				0,0629
CV (%)				0,3964

## 6. Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas

- a. Penentuan *operating time* dan panjang gelombang maksimum ABTS

Dalam menentukan *operating time* dan panjang gelombang dari ABTS dilakukan dengan mencampurkan larutan radikal ABTS 1 mL dengan metanol *p.a* dalam labu ukur 5 mL. *Operating time* yang diperoleh dimulai dari menit ke-27 sampai menit ke-39 yang dapat dilihat pada **Lampiran 13**. Sedangkan untuk hasil pembacaan panjang gelombang pada rentang 600 – 800 nm diperoleh hasil yaitu pada 741 nm dengan absorbansi sebesar 0,401 yang dapat dilihat pada **Gambar 9**.



**Gambar 9. Panjang Gelombang ABTS**

- b. Uji aktivitas peredaman radikal bebas standar asam galat

Pengujian aktivitas peredaman radikal pada standar dibaca absorbansinya dengan OT menit ke-27 – 39 dan menggunakan panjang gelombang maksimum 741 nm, dalam pengujiannya dilakukan 3 kali replikasi. Setelah diperoleh konsentrasi dan absorbansi, maka dapat dihitung nilai % inhibisi dari standar. Hasil perhitungan % inhibisi dan nilai  $IC_{50}$  standar asam galat dapat dilihat pada **Tabel 8**. Sedangkan untuk kurva regresi antara konsentrasi dengan %inhibisi disajikan pada **Lampiran 16**.

**Tabel 8. Aktivitas Peredaman Radikal Bebas Standar Asam Galat**

No	% Inhibisi Standar					Persamaan Regresi Linier	IC <sub>50</sub> (ppm)
	0,2 ppm	0,6 ppm	1 ppm	1,4 ppm	1,8 ppm		
1	36,447	44,558	53,901	58,521	65,195	$y = 17,865x + 33,86$ $r = 0,9963$	0,9034
2	36,755	42,094	48,254	58,316	70,225	$y = 20,791x + 30,338$ $r = 0,9880$	0,9457
3	37,885	42,197	54,004	58,624	65,092	$y = 17,71x + 33,85$ $r = 0,9849$	0,9119
Rata-rata ± LE							0,920± 0,0554
SD							0,0223
CV (%)							2,4321

c. Uji aktivitas peredaman radikal bebas ekstrak jahe hitam

Pengujian aktivitas peredaman radikal terhadap sampel dilakukan sama seperti pada standar. Hasil perhitungan % inhibisi dan nilai IC<sub>50</sub> sampel ekstrak jahe hitam dapat dilihat pada **Tabel 9**. Kurva regresi yang terbentuk antara konsentrasi dengan % inhibisi pada sampel disajikan pada **Lampiran 19**.

**Tabel 9. Aktivitas Peredaman Radikal Bebas Ekstrak Jahe Hitam**

No	% Inhibisi Sampel					Persamaan Regresi Linier	IC <sub>50</sub> (ppm)
	600 ppm	700 ppm	800 ppm	900 ppm	1000 ppm		
1	34,456	40,760	51,847	59,456	66,521	$y = 0,0828x - 15,653$ $r = 0,9964$	796,9106
2	34,565	40,869	49,782	59,239	65,108	$y = 0,0795x - 13,652$ $r = 0,9969$	800,6541
3	33,913	40,978	51,413	58,369	66,304	$y = 0,0833x - 15,543$ $r = 0,9980$	797,3601
Rata-rata ± LE							796,9749 ±9,6544
SD							3,8861
CV (%)							0,4876

## B. Pembahasan

Pada penelitian ini menggunakan tanaman rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora*) yang diperoleh dari Kabupaten Sleman, dengan pengambilan sampel menggunakan teknik *simple random sampling*. *Random sampling* adalah teknik yang digunakan dalam pemilihan sampel

dari suatu populasi secara acak sehingga semua populasi memiliki peluang yang sama untuk diambil sebagai sampel (Harahap *et al.*, 2018). Sebelum melakukan penelitian, tanaman harus dideterminasi terlebih dahulu. Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran identitas dari tanaman yang akan digunakan, dengan adanya determinasi diharapkan dapat meminimalisir terjadinya kesalahan dalam pengumpulan sampel untuk penelitian. Proses determinasi dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta, dimana hasil dari determinasi menyebutkan bahwa tanaman yang akan digunakan sebagai sampel dalam penelitian merupakan *Kaempferia parviflora* wall ex baker.

Tahap awal pembuatan simplisia adalah melakukan sortasi basah pada rimpang jahe hitam dengan tujuan untuk memisahkan kotoran yang masih tertinggal pada rimpang. Selanjutnya dilakukan perajangan yang bertujuan untuk mempercepat proses pengeringan, apabila tingkat ketebalan simplisia semakin rendah (tipis) maka akan mempercepat penguapan kandungan air yang terkandung di dalam simplisia (Restusari *et al.*, 2023). Pengeringan rimpang dilakukan agar kandungan air semakin berkurang sehingga dapat menghambat proses pertumbuhan mikroba. Rimpang dikeringkan menggunakan oven yang diatur pada suhu 50°C selama 48 jam, tujuannya untuk menjaga metabolit sekunder terutama senyawa fenolik yang ada di dalam simplisia agar tidak rusak karena pemanasan yang terlalu tinggi. Pengeringan tanaman dengan suhu 50°C memiliki kadar air simplisia yang lebih rendah serta dapat mencegah rusaknya metabolit sekunder terutama fenolik (Wijaya & Noviana, 2022; Widayanti *et al.*, 2023).

Rimpang jahe hitam yang sudah kering dilakukan pengecekan kadar air simplisia dan diperoleh nilai sebesar 0,53%. Dari hasil kadar air simplisia sudah memenuhi syarat yaitu  $< 10\%$  (Utami *et al.*, 2017). Rimpang kemudian dihaluskan menggunakan grinder agar dapat memperkecil ukuran partikel dan memperluas permukaan partikel, karena semakin kecil ukuran partikel maka akan semakin besar kontak antara partikel simplisia dengan

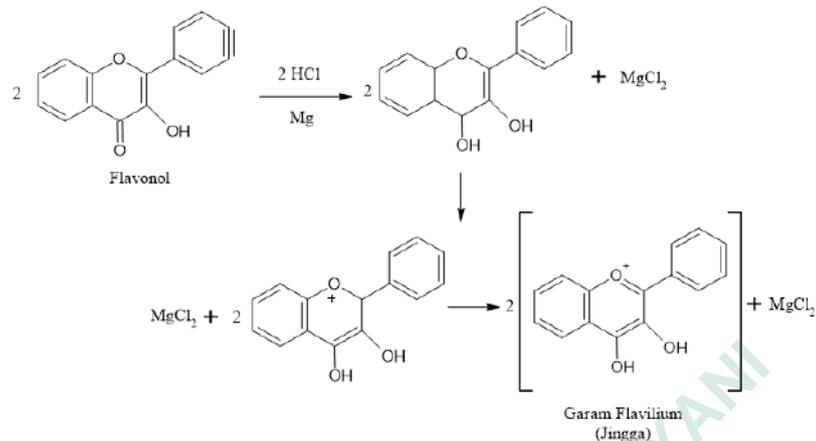
pelarut sehingga akan berpengaruh pada banyaknya zat aktif dalam simplisia yang ikut terbawa ke dalam pelarut selama proses ekstraksi (Zuhro *et al.*, 2022). Selanjut rimpang yang telah halus diayak dengan ayakan 60 mesh untuk mendapatkan ukuran partikel simplisia yang seragam. Hasil akhir yang didapatkan dalam preparasi sampel ialah serbuk kering rimpang jahe hitam, kemudian ditimbang sebesar 100,0 g untuk dilakukan proses ekstraksi menggunakan metode maserasi.

Metode maserasi dipilih karena pada prosesnya tidak memerlukan pemanasan sehingga dinilai lebih efektif agar tidak merusak kandungan metabolit sekunder yang ada di dalam simplisia. Prinsip maserasi yaitu pelarut akan menembus ke dalam dinding sel sehingga zat aktif yang terkandung di dalam simplisia akan ikut terlarut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan diluar sel (Salamah *et al.*, 2017). Maserasi dilakukan selama 72 jam dengan pengadukan dilakukan selama 8 jam sekali agar dapat meningkatkan kontak antara pelarut dengan serbuk simplisia sehingga dapat mempercepat zat aktif dapat larut ke dalam pelarut (Prasetya & Putra, 2020). Setelah melakukan maserasi dilanjutkan proses remaserasi dengan tujuan untuk menarik kandungan zat aktif yang masih tertinggal pada sampel. Remaserasi menggunakan lama waktu yang sama dengan proses maserasi karena semakin lama kontak serbuk simplisia dengan pelarut, maka akan semakin banyak zat aktif dalam simplisia yang ikut tersari (Wahyudi & Minarsih, 2023). Hasil maserat digabungkan dan diuapkan menggunakan suhu 50°C, apabila menggunakan suhu penguapan di atas 50°C, maka senyawa fenolik dapat mengalami perubahan struktur sehingga kandungannya di dalam ekstrak semakin menurun (Kusumawardany *et al.*, 2023).

Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah etanol 96%. Hal tersebut dikarenakan etanol merupakan pelarut universal yang bersifat semi-polar, yang artinya dapat melarutkan senyawa polar maupun non-polar (Nisyak *et al.*, 2022). Kepolaran etanol ini disebabkan adanya gugus hidroksil (-OH) yang bersifat polar, sementara itu gugus etil (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-)

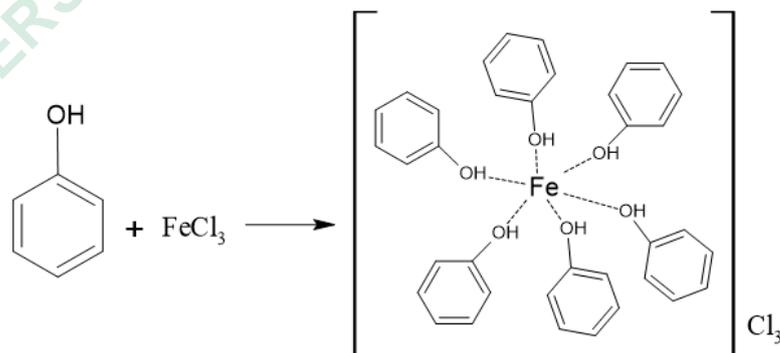
pada etanol memiliki kecenderungan bersifat non-polar (Tobi *et al.*, 2022). Sesuai prinsip “*like dissolve like*”, senyawa fenolik memiliki sifat semi-polar karena adanya gugus benzena yang bersifat non-polar dan gugus –OH yang bersifat polar sehingga pada penelitian ini digunakan pelarut etanol untuk dapat mengekstraksi fenolik secara optimal (Evitasari & Susanti, 2021). Hasil dari penguapan sampel diperoleh ekstrak kental dengan berat sebesar 17,4047 g serta nilai rendemen sebesar 17,4047%. Berdasarkan penelitian Mishra & Sharma, (2021) diperoleh nilai rendemen sebesar 9,68%, sedangkan pada penelitian Choi *et al.*, (2018) diperoleh nilai rendemen sebesar 32,46%. Nilai rendemen yang semakin tinggi maka menandakan nilai ekstrak yang diperoleh semakin banyak. Hasil rendemen juga berkaitan dengan senyawa aktif di dalam sampel. Semakin tinggi nilai rendemen maka semakin banyak pula fenolik yang terkandung pada sampel (Syamsul *et al.*, 2020; Hidayah & Anggarani, 2022). Penelitian dilanjutkan pada pengujian kualitatif dengan skrining fitokimia ekstrak jahe hitam. Pengujian ini sebagai tahap pendahuluan untuk memberikan gambaran mengenai metabolit sekunder dalam ekstrak yang akan diteliti.

Pengujian fitokimia pertama yaitu senyawa flavonoid dilakukan dengan memanaskan dan mereaksikan sampel ekstrak jahe hitam dengan reagen serbuk magnesium dan HCl pekat. Proses pemanasan dilakukan karena sebagian besar golongan flavonoid dapat larut dalam air panas. Penambahan logam magnesium dan larutan HCl pekat bertujuan untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat dalam struktur flavonoid, ketika terjadi reduksi akan membuat campuran menghasilkan kompleks berwarna jingga atau merah yang menandakan terbentuknya suatu garam flavilium (Munadi & Arifin, 2022). Dari hasil pengujian sampel ekstrak jahe hitam yang semula berwarna coklat terang mengalami perubahan menjadi jingga kemerahan yang menandakan positif mengandung flavonoid. Reaksi terbentuknya garam flavilium dapat dilihat pada **Gambar 10**.



**Gambar 10. Reaksi Pembentukan Garam Flavilium** (Munadi & Arifin, 2022)

Pengujian fitokimia kedua adalah senyawa fenolik dilakukan dengan mereaksikan sampel ekstrak jahe hitam dengan reagen FeCl<sub>3</sub> 5%. Ketika sampel bereaksi dengan FeCl<sub>3</sub> akan terbentuk warna hijau kehitaman, hal tersebut terjadi karena adanya reaksi antara gugus hidroksil yang ada pada senyawa fenol dengan reagen FeCl<sub>3</sub> (Fernando *et al.*, 2023). Dari hasil pengujian sampel yang semula berwarna coklat terang mengalami perubahan menjadi hijau kehitaman menandakan positif mengandung fenolik. Reaksi FeCl<sub>3</sub> dengan gugus hidroksil pada fenolik yang ditunjukkan pada **Gambar 11**.

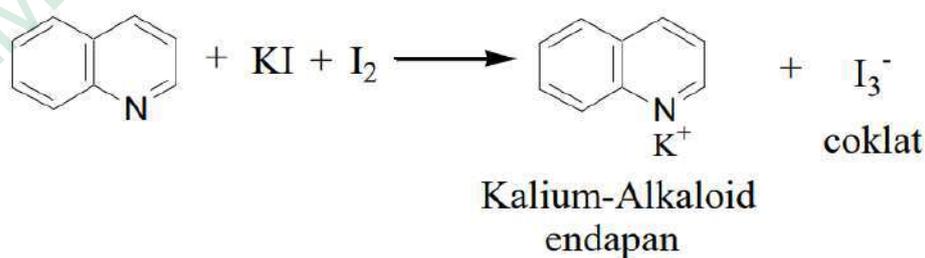


**Gambar 11. Reaksi Kompleks Antara Fenol dengan FeCl<sub>3</sub>** (Erlidawati & Zahrina, 2023)

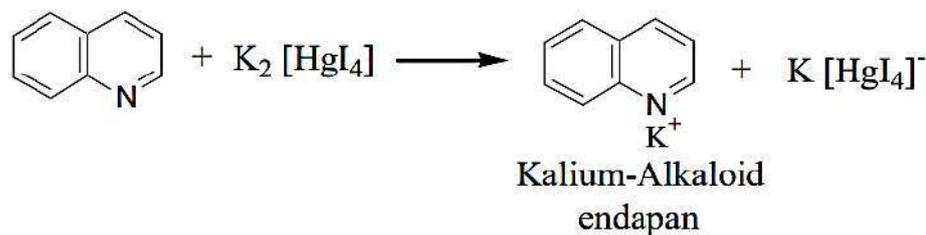
Pengujian fitokimia ketiga adalah senyawa alkaloid dilakukan dengan mereaksikan sampel ekstrak jahe hitam dengan HCl 2 N yang bertujuan untuk menarik senyawa alkaloid yang cenderung bersifat basa dengan

adanya penambahan asam dari HCl sehingga akan terbentuk garam alkaloid. Setelah itu direaksikan kembali dengan tiga jenis reagen yaitu Wagner, Mayer, dan Dragendroff. Pada pengujian dengan reagen Wagner, ion logam  $K^+$  akan membentuk suatu ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid dan membentuk kompleks kalium-alkaloid dengan timbul endapan coklat. Pada pengujian dengan reagen Mayer, nitrogen dari alkaloid akan bereaksi dengan logam  $K^+$  dari kalium tetraiodomercurat(II) akan membentuk kompleks kalium-alkaloid dengan endapan kekuningan. Sedangkan pada pengujian dengan reagen Dragendroff, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan logam  $K^+$  dari kalium tetraiodobismutrat(III) sehingga akan terbentuk suatu endapan jingga (Fajrin & Susila, 2019).

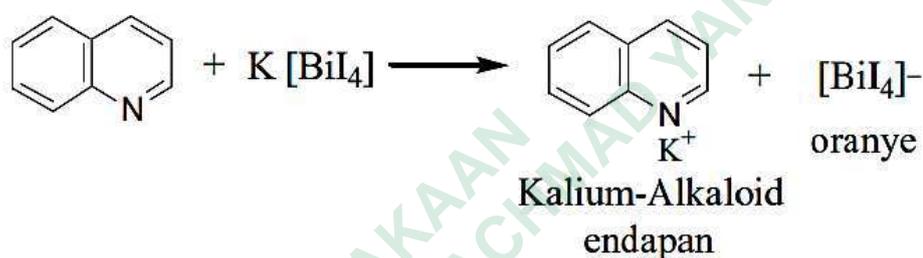
Dari hasil pengujian sampel yang semula berwarna coklat terang mengalami perubahan ketika ditambahkan HCl akan menjadi warna merah muda kemudian ketika direaksikan dengan reagen Wagner terbentuk endapan coklat kehitaman, reagen Mayer terbentuk endapan kekuningan, sedangkan pada Dragendroff terbentuk endapan jingga. Ketiganya menandakan positif mengandung alkaloid. Reaksi yang terjadi dengan reagen Wagner dapat dilihat pada **Gambar 12**, reaksi dengan reagen Mayer pada **Gambar 13**, dan reaksi dengan reagen Dragendroff pada **Gambar 14**.



**Gambar 12. Reaksi Uji Wagner** (Maulidina & Parbuntari, 2023)

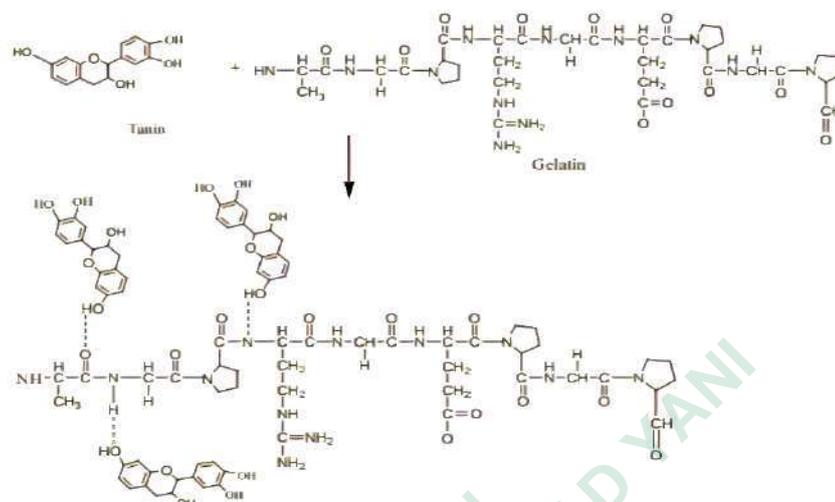


**Gambar 13. Reaksi Uji Mayer** (Maulidina & Parbuntari, 2023)



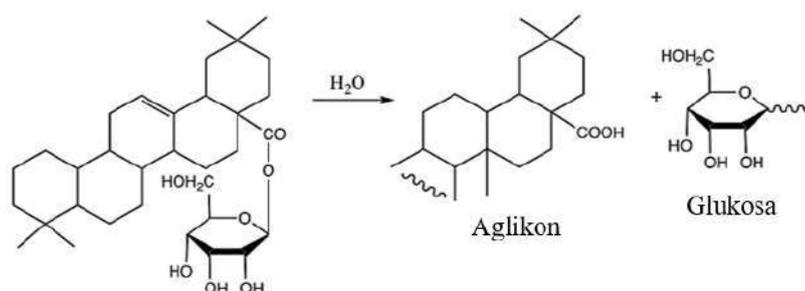
**Gambar 14. Reaksi Uji Dragendorff** (Maulidina & Parbuntari, 2023)

Pengujian keempat adalah senyawa tanin menggunakan metode gelatin *test*, alasannya karena dengan metode ini akan menunjukkan hasil yang lebih spesifik untuk mendeteksi senyawa tanin. Uji dilakukan dengan mereaksikan sampel ekstrak jahe hitam dengan dua reagen gelatin dan natrium klorida (NaCl). Senyawa tanin merupakan polihidroksi fenol yang dapat dibedakan dari fenol lain karena memiliki kemampuan untuk mengendapkan protein, hal tersebut dibuktikan apabila tanin direaksikan dengan gelatin akan terbentuk endapan, karena gelatin merupakan salah satu jenis protein yang dapat diendapkan oleh senyawa tanin. Terbentuknya endapan dalam larutan disebabkan adanya ikatan hidrogen antara tanin dan protein pada gelatin. Ikatan hidrogen yang terbentuk disebabkan oleh atom H yang terikat dengan 2 atom O ataupun terikat dengan atom O dan N dari struktur tanin dan gelatin (Ikalinus *et al.*, 2015). Dari hasil pengujian yang semula sampel berwarna coklat terang akan timbul endapan berwarna putih kekuningan. Uji tanin dengan reagen gelatin memberikan hasil positif. Reaksi tanin-gelatin dapat dilihat pada **Gambar 15**.



**Gambar 15. Reaksi Pembentukan Endapan Tanin-Gelatin** (Nur *et al.*, 2022)

Pengujian terakhir adalah pada senyawa saponin dilakukan dengan penambahan *aquadest*. Saponin adalah senyawa yang memiliki permukaan kuat sehingga akan timbul busa ketika dikocok kuat dengan campuran air. Oleh karena itu, saponin dapat dideteksi dengan mengocok campuran ekstrak + air, kemudian akan timbul busa yang bertahan lama. Munculnya buih pada uji saponin menunjukkan buih glikosida dalam air yang dihidrolisis menjadi glukosa serta senyawa-senyawa lain (Maulidina & Parbuntari, 2023). Namun setelah dilakukan pengujian terhadap sampel ekstrak jahe hitam menunjukkan hasil yang negatif karena tidak timbul busa pada larutan sampel. Reaksi terbentuknya busa dalam uji saponin dapat dilihat pada **Gambar 16**.



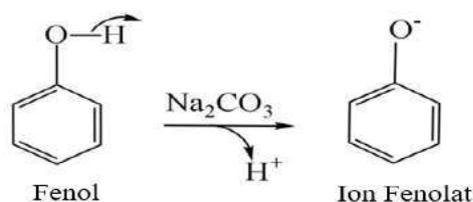
1-Arabinopiriosil-3β-asetil oleanolat

**Gambar 16. Reaksi Pembentukan Busa pada Saponin** (Erlidawati & Zahrina, 2023)

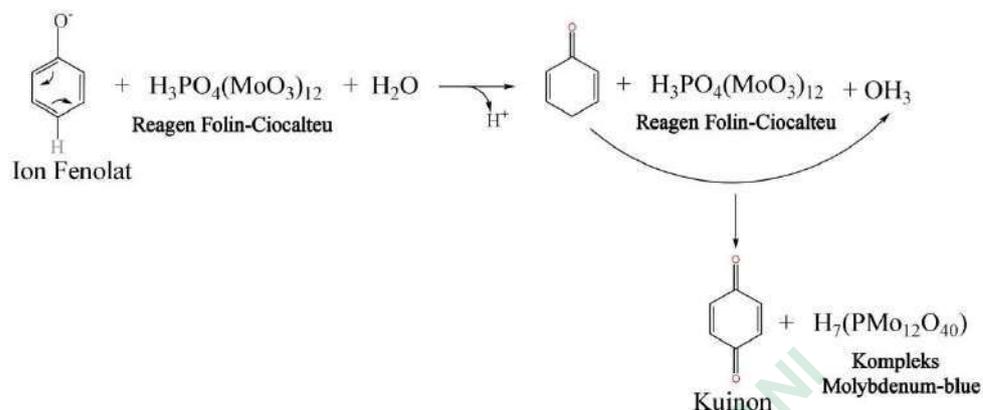
Setelah melakukan skrining fitokimia sebagai uji kualitatif, maka dapat dilanjutkan pada pengujian secara kuantitatif untuk mengetahui kadar fenolik total dan aktivitas peredaman radikal bebas pada ekstrak jahe hitam.

Penetapan fenolik total dilakukan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis. Penggunaan instrumen tersebut dikarenakan senyawa fenolik memiliki gugus kromofor dan auksokrom berupa gugus hidroksil (-OH). Selain itu, adanya gugus -OH tersebut dapat mengakibatkan terjadinya reaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu sehingga akan terbentuk kompleks warna dan dapat dibaca pada daerah *visible*, yaitu pada panjang gelombang 400 – 800 nm (Supriningrum *et al.*, 2020).

Dalam analisisnya penetapan kadar fenolik menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Prinsip metode ini yaitu adanya reduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) oleh gugus aromatis pada senyawa fenolik sehingga akan terbentuk kompleks molibdenum-tungsten yang ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi biru ketika bereaksi dalam suasana yang basa (Senet *et al.*, 2018). Reaksi yang dihasilkan oleh reagen Folin-Ciocalteu dengan senyawa fenolik hanya akan terjadi pada larutan dengan suasana basa karena proton yang ada dalam senyawa fenolik akan terdisosiasi menjadi ion fenolat. Oleh karena itu, diperlukan adanya penambahan natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) untuk merubah larutan menjadi lebih basa (Dewantara *et al.*, 2021). Reaksi fenol dengan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan Folin-Ciocalteu dapat dilihat pada **Gambar 17** dan **Gambar 18**. Standar yang digunakan dalam penetapan kadar fenolik yaitu asam galat karena salah satu fenol alami yang bersifat stabil, serta asam galat masih merupakan turunan asam hidroksibenzoat yang tergolong asam fenol yang sederhana (Ahmad *et al.*, 2015; Senet *et al.*, 2018).



**Gambar 17. Pembentukan Ion Fenolat Dalam Suasana Basa** (Pallawagau *et al.*, 2019)



**Gambar 18. Reaksi Ion Fenolat dengan Folin-Ciocalteu** (Pallawagau *et al.*, 2019)

Pada uji ini diawali dengan mencari *operating time* dari asam galat. Tujuan penentuan *operating time* adalah untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil dari suatu senyawa dengan melihat absorbansi yang dihasilkan (Sadik, 2023). Dalam membentuk kompleks senyawa yang stabil antara asam galat dengan reagen Folin-Ciocalteu dan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  membutuhkan waktu untuk bereaksi sehingga perlu diketahui *operating time*. Pada penelitian ini diperoleh *operating time* yang dimulai dari menit ke-54 sampai menit ke-60. Hasil *operating time* mendekati penelitian yang dilakukan oleh Gultom *et al.*, (2021) yaitu OT stabil pada menit ke-55. Setelah mendapatkan *operating time* dilanjutkan dengan menentukan panjang gelombang optimum dari asam galat dengan konsentrasi 30 ppm yang dibaca pada rentang serapan 600 – 800 nm. Penentuan ini bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang yang dapat memberikan serapan maksimum. Hal ini dilakukan setelah memperoleh *operating time* agar dapat menunggu reaksi asam galat dengan Folin-Ciocalteu dalam membentuk kompleks warna yang awalnya tidak stabil menjadi lebih stabil. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh panjang gelombang maksimum yaitu 770 nm dengan absorbansi 0,279. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Kusumiati & Rawar, (2022) yaitu pada  $\lambda$  770 nm dengan absorbansi sebesar 0,348.

Selanjutnya dilakukan penentuan kurva baku agar dapat mengetahui hubungan konsentrasi standar asam galat dengan nilai absorbansi. Kurva baku ini digunakan untuk mengetahui kadar fenolik yang terkandung di dalam sampel. Berdasarkan hasil kurva baku asam galat pada **Tabel 6** diketahui bahwa adanya peningkatan absorbansi seiring dengan peningkatan konsentrasi dari standar asam galat. Hal tersebut sesuai dengan prinsip pada Hukum *Lambert-Beer* yang menyebutkan bahwa nilai absorbansi berbanding lurus (linier) dengan konsentrasi sampel (Rantung *et al.*, 2021). Dari kurva ini diperoleh persamaan regresi linier  $y = 0,0075x + 0,045$  dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) hitung yaitu  $0,9985 > r$  tabel  $0,8783$ . Berdasarkan nilai  $r$  hitung yang mendekati 1 ( $r \leq 1$ ), serta  $r =$  positif (+), maka dapat dikatakan linier pada hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi, dimana hal tersebut sudah sesuai dengan Hukum *Lambert-Beer* (Primadiamanti *et al.*, 2019). Setelah diperoleh persamaan regresi, maka dapat dilakukan perhitungan kadar total fenolik pada sampel ekstrak jahe hitam dengan tiga kali replikasi.

Berdasarkan hasil perhitungan kadar fenolik total diperoleh rata-rata ( $\bar{y} \pm LE$ ) sebesar  $15,8667 \pm 0,1562$  mgGAE/g ekstrak. Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Mishra & Sharma, (2021) nilai fenolik total sebesar 1,047 mgGAE/100 mg, sedangkan pada penelitian Choi *et al.*, (2018) diperoleh nilai fenolik total sebesar  $43,13 \pm 1,49$  mgGAE/g. Perbedaan kadar fenolik total yang diperoleh pada ekstrak jahe hitam dapat disebabkan oleh beberapa hal, yaitu pada penelitian sebelumnya lokasi pengambilan jahe hitam berasal dari Thailand dan India, pelarut yang digunakan adalah etanol 95%, dan menggunakan suhu  $40^\circ\text{C}$  untuk ekstraksi. Berdasarkan data penelitian diperoleh nilai standar deviasi (SD) yaitu 0,0629 serta nilai koefisien variasi (CV) sebesar 0,3964%. Pada nilai CV yang diperoleh sudah memenuhi persyaratan yang baik yaitu  $\leq 5\%$  (Wardhani & Nurbayanti, 2017). Setelah mendapatkan kadar fenolik total sampel, maka penelitian dilanjutkan pada proses pengujian aktivitas peredaman radikal bebas pada standar dan ekstrak jahe hitam.

Pada uji peredaman radikal bebas penelitian ini menggunakan ABTS sebagai metode pengujiannya. Metode ini dilihat dari kemampuan suatu senyawa antioksidan untuk mendonorkan radikal proton agar dapat menstabilkan ABTS yang berperan sebagai radikal bebas (Sukweenadhi *et al.*, 2020). Parameter dari pengujian adalah nilai *Inhibitory Concentration* ( $IC_{50}$ ). Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  suatu senyawa maka semakin kuat aktivitas antioksidan dalam meredam radikal bebas.

Dalam membuat radikal ABTS perlu adanya penambahan reagen yaitu kalium persulfat ( $K_2S_2O_8$ ) yang akan mengoksidasi larutan ABTS sehingga akan terbentuk suatu radikal bebas. Reaksi oksidasi antara larutan ABTS dengan  $K_2S_2O_8$  terjadi secara stoikiometri, akan membentuk suatu radikal ABTS ditandai dengan perubahan warna yang semula hampir tidak berwarna menjadi warna biru kehijauan (Ilyasov *et al.*, 2020). Agar reaksi dapat terjadi maksimal, maka perlu adanya inkubasi selama 12-16 jam pada suhu ruang ditempat yang gelap.

Langkah awal pengujian ini yaitu melakukan penentuan *operating time* yang bertujuan untuk mengetahui waktu stabil yang dimiliki radikal ABTS sebelum digunakan untuk pengujian terhadap larutan uji. Pembacaan *operating time* dilakukan selama 45 menit, dimulai dari menit ke-1 sampai menit ke-45 dengan interval waktu tiap satu menit. *Operating time* diperoleh pada menit ke-27 sampai menit ke-39. Hasil pengukuran *operating time* tidak berbeda jauh dengan penelitian sebelumnya yaitu stabil pada menit ke-25 sampai menit ke-35 (Yumni *et al.*, 2022). Selanjutnya dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum ABTS pada rentang  $\lambda$  600 – 800 nm. Diperoleh hasil  $\lambda$  maksimum yaitu 741 nm dengan absorbansi 0,401. Hasil yang diperoleh tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Yumni *et al.*, (2022) yaitu  $\lambda$  maksimum ABTS sebesar 743 nm. Adanya perbedaan panjang gelombang dalam penelitian ini masih dapat ditoleransi karena tidak lebih dari 3 nm (FI ed IV).

Setelah mendapatkan OT dan  $\lambda$  maksimum maka dilanjutkan dengan melakukan uji peredaman radikal bebas pada standar. Pada penelitian ini

asam galat digunakan sebagai standar karena asam galat masih termasuk senyawa fenolik sehingga memiliki aktivitas antioksidan alami (Wulandari *et al.*, 2022). Senyawa fenolik dapat berpotensi sebagai antioksidan karena memiliki gugus –OH dalam senyawa fenol. Gugus –OH berfungsi sebagai pendonor atom hidrogen ketika bereaksi dengan radikal bebas dengan mekanisme transfer elektron sehingga akan menghambat proses oksidasi (Allo *et al.*, 2022). Pengujian dilakukan dengan mereaksikan 1 mL asam galat dengan 2 mL radikal ABTS (1:2). Adanya aktivitas peredaman radikal bebas dari standar asam galat ditunjukkan dengan perubahan warna, dimana warna dari ABTS yang semula biru kehijauan akan memudar dengan adanya penambahan asam galat. Dari hasil pengujian diperoleh persamaan regresi linier antara konsentrasi standar dengan % inhibisi setelah dilakukan tiga kali replikasi, yaitu pada replikasi I  $y = 17,865x + 33,86$  nilai  $r$  sebesar 0,9936, replikasi II  $y = 20,791x + 30,338$  nilai  $r$  sebesar 0,9849, dan replikasi III  $y = 17,71x + 33,85$  nilai  $r$  sebesar 0,9884. Dari ketiga replikasi tersebut memiliki nilai  $r$  hitung  $> r$  tabel yaitu 0,8783 maka regresi linier dapat dikatakan valid. Dari hasil persamaan regresi linier tersebut digunakan untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  standar sehingga diperoleh rata-rata ( $\bar{x}$ ) $\pm$ LE sebesar  $0,9203 \pm 0,0554$  ppm dengan kategori antioksidan sangat kuat ( $< 50$  ppm), nilai standar deviasi (SD) yaitu 0,0223 serta nilai koefisien variasi (CV) sebesar 2,4231%. Dari nilai CV yang didapat menunjukkan bahwa data penelitian sudah seragam karena CV yang diperoleh sudah memenuhi persyaratan yaitu  $\leq 5\%$  (Wardhani & Nurbayanti, 2017).

Setelah memperoleh  $IC_{50}$  dari standar, maka dilanjutkan uji peredaman radikal bebas pada ekstrak etanol 96% rimpang jahe hitam. Pengujian dilakukan dengan mereaksikan larutan sampel dengan radikal ABTS (1:2). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh persamaan regresi linier antara konsentrasi sampel dengan % inhibisi setelah dilakukan tiga kali replikasi, yaitu pada replikasi I  $y = 0,0828x - 15,653$  nilai  $r$  sebesar 0,9964, replikasi II  $y = 0,0795x - 13,652$  nilai  $r$  sebesar 0,9969, dan replikasi III  $y = 0,0822x - 15,543$  nilai  $r$  sebesar 0,9980. Berdasarkan ketiga replikasi

tersebut memiliki nilai  $r$  hitung  $> r$  tabel yaitu 0,8783, maka regresi linier dapat dikatakan valid. Setelah itu dihitung nilai IC<sub>50</sub> dari sampel dan didapatkan hasil rata-rata( $\bar{\chi}$ ) $\pm$ LE sebesar 796,9749 $\pm$ 9,6544 ppm dengan kategori antioksidan yaitu sangat lemah ( $>200$  ppm), nilai SD sebesar 3,8861, dan untuk nilai CV didapatkan sebesar 0,4876%. Nilai CV yang diperoleh sudah memenuhi persyaratan yaitu  $\leq 5\%$  sehingga menunjukkan bahwa data yang diperoleh sudah seragam.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Choi *et al.*, (2018) menggunakan pelarut etanol 95% dengan metode ABTS memperoleh IC<sub>50</sub> sebesar 3,17 $\pm$ 0,08 mg/mL dan metode DPPH dengan IC<sub>50</sub> sebesar 0,48 $\pm$ 0,30 mg/mL. Nilai IC<sub>50</sub> yang telah diperoleh pada penelitian ini memiliki perbedaan yang cukup jauh jika dibandingkan dengan penelitian Choi *et al.*, (2018). Hal tersebut dikarenakan terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan dari sampel, yaitu lokasi pengambilan sampel dimana pada penelitian sebelumnya jahe hitam berasal dari negara Thailand, menggunakan pelarut etanol 95%, lama waktu maserasi yaitu 48 jam, dan suhu ekstraksi yang digunakan yaitu sekitar 40°C. Sedangkan pada penelitian ini menggunakan jahe hitam yang berasal dari Indonesia, ekstraksi dengan pelarut etanol 96%, lama maserasi yaitu 72 jam, serta suhu ekstraksi sebesar 50°C. Apabila dilihat dari beberapa faktor tersebut dapat mempengaruhi nilai IC<sub>50</sub> yang menggambarkan aktivitas antioksidan dari sampel terutama pada penggunaan waktu maserasi, suhu ekstraksi, dan penggunaan pelarut.

Secara teoritis semakin tinggi kadar fenolik maka akan semakin tinggi kemampuan antioksidan mendonorkan elektronnya dalam hal meredam perkembangan radikal bebas sehingga akan mendapatkan nilai IC<sub>50</sub> yang semakin kecil (Nur *et al.*, 2019; Wardani *et al.*, 2020). Berdasarkan hasil penelitian ini memiliki nilai rendemen tidak terlalu besar, hal tersebut dapat berpengaruh pada banyaknya kandungan fenolik yang terbawa pada saat proses ekstraksi, seperti yang sudah disebutkan sebelumnya semakin tinggi rendemen maka akan semakin banyak fenolik

yang terbawa dalam sampel. Dari hasil rendemen tersebut dapat dihubungkan pada kadar fenolik total yang diperoleh menjadi tidak terlalu tinggi sehingga akan berpengaruh terhadap hasil antioksidan sampel menjadi sangat lemah. Jika dibandingkan dengan penelitian Choi *et al*, (2018) memiliki nilai rendemen yang lebih tinggi sehingga dapat menghasilkan perbedaan pada kadar fenolik total dan aktivitas antioksidan dalam sampel ekstrak jahe hitam.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI  
PERPUSTAKAAN  
YOGYAKARTA