

BAB III

MEODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan yaitu penelitian eksperimental dengan menggunakan metode deskriptif dan analitik. Metode deskriptif digunakan untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya kandungan senyawa flavonoid, fenolik, alkaloid, tanin, dan steroid pada sampel. Sedangkan metode analitik diterapkan untuk menentukan nilai aktivitas peredaman radikal bebas DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) pada ekstrak etanol jahe hitam (*Kaempferia parviflora* Wall.) dengan variasi konsentrasi pelarut etanol yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan parameter IC_{50} sebagai indikator efektivitas antioksidan.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi, Program Studi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Ahmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April – Juni 2025.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora* Wall.) yang didapatkan dari KH. Garden Pekanbaru, Jl. Keliling, Gn. Gayo Pekanbaru Riau.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini menggunakan rimpang jahe hitam berusia 9 bulan, dengan teknik pengambilan sampel secara *simple random sampling*, di mana sampel diambil secara acak dari seluruh populasi tanpa membedakan kelompok atau kategori tertentu.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Dalam penelitian ini, variabel bebas mencakup variasi konsentrasi pelarut etanol yang terdiri dari 50%, 70%, dan 96%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini berupa aktivitas peredaman radikal bebas DPPH ekstrak rimpang jahe hitam dengan nilai IC_{50} sebagai parameter.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini, yaitu periode umur panen rimpang (9 bulan), suhu pengeringan ($50^{\circ}C$), waktu ekstraksi (20 menit), suhu ekstraksi ($45^{\circ}C$), gelombang frekuensi ekstraksi sonikasi 40 kHz, pengayakan (60 mesh), dan tempat penyimpanan larutan DPPH.

E. Definisi Operasional

1. Rimpang jahe hitam (*Kaempferia parviflora* Wall.) diperoleh dari KH. Garden Pekanbaru, Jl. Keliling, Gn. Gayo Pekanbaru Riau. Selanjutnya diekstraksi menggunakan metode UAE (*Ultrasound-Assisted Extraction*) dengan memvariasikan konsentrasi pelarut etanol yaitu 50%, 70%, dan 96%.
2. Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menghambat atau menangkap molekul radikal bebas berupa DPPH yang dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal (nm).
3. Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi ekstrak etanol rimpang jahe hitam yang dapat mengikat 50% radikal bebas DPPH.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian yaitu spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV Vis*), timbangan analitik (*Ohaus*), mikropipet (*Ohaus*), set alat gelas (*Iwaki*), sonikator (*GT Sonic-R6*), oven (*Binder*), grinder, ayakan mesh 60, dan *moisture analyzer* (*Ohaus*).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu rimpang jahe hitam yang diperoleh dari KH. Garden Pekanbaru, Jl. Keliling, Gn. Gayo Pekanbaru Riau, etanol 50% (Teknis), 70% (Teknis), dan 96% (Teknis), etanol *p.a* (Merck), DPPH (*1,1-Diphenyl-1-Picrylhydrazil*) (Himedia), kuersetin (Sigma), akuades (Teknis), *blue tip*, kertas saring, serbuk magnesium (Merck), HCl *p.a* (Mallinckrodt), HCl 2N (Mallinckrodt), kloroform (Merck), FeCl₃ (Merck), pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, pereaksi Bouchardat, gelatin 1% (Teknis), dan H₂SO₄ *p.a* (Mallinckrodt).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman Jahe Hitam

Rimpang jahe hitam diperoleh dari KH. Garden Pekanbaru, Jl. Keliling, Gn. Gayo Pekanbaru Riau dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Ahmad Dahlan.

2. Penyiapan Sampel

a. Pengolahan simplisia

Rimpang jahe hitam yang telah dipanen disortir basah dan dilakukan pencucian sampai bersih, lalu ditiriskan dan dikeringkan dengan matahari. Selanjutnya, rimpang jahe hitam disortir kering untuk memastikan tidak adanya pengotor yang tersisa. Sebelum sampel dimasukkan ke dalam oven pada suhu 50°C untuk dikeringkan, terlebih dahulu dilakukan perajangan untuk memudahkan dan memaksimalkan proses pengeringan dengan tujuan mengurangi kadar air hingga kurang dari 10%. Setelah proses pengeringan selesai, rimpang jahe hitam digiling menggunakan grinder hingga halus kemudian diayak dengan pengayak mesh 60 untuk memperoleh ukuran serbuk jahe hitam yang seragam (Wahyudi & Minarsih, 2023).

b. Pembuatan ekstrak rimpang jahe hitam

Serbuk jahe hitam yang diperoleh ditimbang sebanyak 50 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1000 mL dengan pelarut etanol 50%, 70%, dan 96% sebanyak 500 mL (1:10). Setelah itu, dilakukan ekstraksi

dengan bantuan gelombang ultrasonik frekuensi 40 kHz pada suhu 45°C selama 20 menit. Hasil ekstraksi yang diperoleh disaring dengan menggunakan kertas Whatman no. 1, lalu filtrat yang didapat diuapkan pada suhu 50°C (Sekarsari *et al.*, 2019; Hanifa *et al.*, 2024) Selanjutnya, ekstrak kental yang diperoleh dihitung persen rendemen dengan rumus sebagai berikut:

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

3. Uji Skrining Fitokimia

a. Uji flavonoid

Ditimbang sebanyak 50 mg ekstrak jahe hitam dan ditambahkan dengan etanol *p.a* sebanyak 15 mL, kemudian larutan dididihkan selama 5 menit. Selanjutnya, larutan disaring dan diambil sebanyak 5 mL filtrat yang didapat, lalu ditambahkan serbuk magnesium 50 mg dan HCl pekat sebanyak 1 mL. Positif mengandung flavonoid jika terdapat perubahan warna sampel menjadi kuning, jingga, atau merah (Hanifa *et al.*, 2024).

b. Uji fenolik

Ekstrak jahe hitam ditimbang 2 mg, kemudian dilarutkan dalam 2 mL etanol *p.a* lalu ditetesi dengan 2 tetes larutan FeCl₃ 5%. Perubahan warna menjadi hijau kehitaman digunakan sebagai indikator adanya senyawa fenolik dalam sampel (Hanifa *et al.*, 2024).

c. Uji alkaloid

Ekstrak jahe hitam ditimbang 2 mg, kemudian ditambahkan HCl 2N sebanyak 1 mL dan akuades 5 mL, lalu ditetaskan pereaksi Dragendorff sebanyak 3 tetes. Selanjutnya ditimbang kembali ekstrak jahe hitam sebanyak 2 mg, ditambahkan dengan 1 mL HCl 2 N dan 5 mL akuades, lalu ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes. Dengan cara yang sama, ditimbang ekstrak jahe hitam sebanyak 2 mg, ditambahkan dengan HCl 2N 1 mL, akuades 5 mL, dan 1-2 tetes pereaksi Bouchardat. Hasil dikatakan positif mengandung alkaloid jika pada pereaksi dragendorff membentuk endapan merah, pada pereaksi mayer terbentuk endapan putih, dan pada

pereaksi bouchardat terbentuk endapan yang memiliki warna coklat kehitaman (Suyudi *et al.*, 2024; Nafiisah *et al.*, 2024).

d. Uji tanin

Sebanyak 20 mg ekstrak jahe hitam ditimbang dan didihkan selama 3 menit dengan akuades 10 mL. Selanjutnya, diambil 2 mL larutan ekstrak kemudian ditambahkan dengan sedikit gelatin 1% dan NaCl 10% sebanyak 10 mL (1:1). Positif mengandung tanin jika terbentuk endapan yang memiliki warna kekuningan (Hanifa *et al.*, 2024).

e. Uji steroid

Ekstrak jahe hitam ditimbang 100 mg dan ditambahkan dengan 2 mL kloroform, lalu digojog. Selanjutnya, larutan disaring dan filtrat yang diperoleh ditambahkan H₂SO₄ pekat sebanyak 2 mL melalui dinding tabung reaksi. Hasil dinyatakan positif mengandung steroid jika terdapat cincin berwarna merah (Hanifa *et al.*, 2024).

4. Analisis Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan larutan DPPH (50 ppm)

Ditimbang DPPH sebanyak 5 mg pada timbangan analitik di laboratorium kimia dan dilarutkan dengan etanol *p.a* pada labu ukur 100 mL, kemudian disimpan dalam wadah gelap atau dilapisi dengan menggunakan aluminium foil (Salikode *et al.*, 2024)

b. Pembuatan larutan baku kuersetin (50 ppm)

Kuersetin ditimbang seksama sebanyak 100,0 mg dan dilarutkan dengan etanol *p.a* pada labu ukur 100,0 mL, lalu digojog sehingga akan diperoleh konsentrasi larutan induk kuersetin 1000 ppm. Setelah itu, larutan induk diencerkan menjadi 50 ppm dengan diambil 0,5 mL larutan kuersetin dan di *add* 10 mL etanol. Setelah itu, dari konsentrasi 50 ppm dibuat seri konsentrasi 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; dan 4,5 ppm sebanyak 10,0 mL (Hanifa *et al.*, 2024).

c. Penentuan *Operating Time* (OT)

Operating Time dilakukan dengan cara dipipet 2 mL larutan DPPH, ditambahkan larutan kuersetin konsentrasi 2,5 ppm sebanyak 2 mL, lalu

ditambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas pada labu ukur 10,0 mL. Larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum teoritis (517 nm) dengan interval waktu 1 menit untuk rentang 0-60 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil, yaitu ketika grafik pada alat spektrofotometer UV-Vis menunjukkan tidak berubah-ubah dan konsisten (Pratiwi *et al.*, 2024).

d. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Diambil 2 mL DPPH 50 ppm dan ditambahkan kuersetin konsentrasi 2,5 ppm sebanyak 2 mL, lalu ditambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas pada labu ukur 10,0 mL. selanjutnya, digojog sampai homogen dan larutan diinkubasi selama *Operating Time* pada suhu ruang dengan wadah ditutup atau dilapisi aluminium foil agar terhindar dari paparan cahaya. Selanjutnya larutan dibaca panjang gelombang maksimum dengan rentang 400-800 nm (Hanifa *et al.*, 2024).

e. Penyiapan larutan kontrol

Sebanyak 2,0 mL larutan DPPH 50 ppm ditambahkan dengan etanol *p.a* sebanyak 2,0 mL dan digojog sampai homogen. Campuran tersebut diinkubasi selama *Operating Time* dalam wadah tertutup aluminium foil dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan (Hanifa *et al.*, 2024).

f. Pembuatan dan Pengukuran larutan pembanding kuersetin

Larutan induk kuersetin diambil dari tiap konsentrasi sebanyak 2 mL dan ditambahkan DPPH 50 ppm sebanyak 2 mL, lalu dihomogenkan. Selanjutnya, diinkubasi sesuai *Operating Time* dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (Hanifa *et al.*, 2024).

g. Pembuatan larutan sampel ekstrak jahe hitam (10.000 ppm)

Ekstrak jahe hitam ditimbang seksama sebanyak 100,0 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol *p.a* hingga 10,0 mL. Setelah itu, dibuat seri konsentrasi 150, 250, 350, 450, dan 550 ppm sebanyak 10,0 mL (Hanifa *et al.*, 2024).

h. Uji aktivitas antioksidan

Masing-masing seri konsentrasi ekstrak jahe hitam diambil 2,0 mL, kemudian ditambahkan DPPH 50 ppm sebanyak 2,0 mL. Selanjutnya, dihomogenkan dan diinkubasi selama *Operating Time* dan dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimal menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Uji antioksidan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (Hanifa *et al.*, 2024).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Perhitungan IC₅₀

Analisis aktivitas peredaman radikal bebas dilakukan dengan menggunakan metode DPPH berdasarkan % inhibisi atau persentase kemampuan penghambatan. % inhibisi dapat diperoleh dari persamaan berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Untuk menentukan nilai IC₅₀ maka menggunakan persamaan regresi linier antara konsentrasi larutan uji (x) dengan % inhibisi (y) dengan rumus:

$$y = bx + a$$

Berdasarkan rumus, dalam setiap sampel nilai y dinyatakan sebesar 50 dan nilai x yang diperoleh dinyatakan sebagai nilai IC₅₀.

$$IC_{50}(x) = \frac{50 - a}{b}$$

Dari nilai IC₅₀ yang diperoleh, dapat menentukan nilai rata-rata (\bar{x}), Standar Deviasi (SD), Koefisien Variasi (KV), dan *Limit of error* (LE) (Hanifa *et al.*, 2024).

2. Analisis Data Statistik

Analisis statistik dilakukan terhadap ekstrak jahe hitam menggunakan aplikasi *Statistical Analysis Software* (SPSS). Pertama, dilakukan uji prasyarat untuk menentukan apakah data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak melalui uji normalitas dan homogenitas. Hasil dari uji normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Jika data yang didapat menunjukkan pola distribusi normal dan homogen, dilanjutkan

parametrik *One-Way* ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95%. Namun, Jika data tidak normal dan tidak homogen atau salah satunya, dilanjutkan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* (Hanifa *et al.*, 2024). Jika data menunjukkan perbedaan maka dilanjutkan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui variable mana yang memiliki perbedaan (Handayani *et al.*, 2025).

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA