

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 3 bulan yaitu dari bulan Januari-Maret 2025 di Laboratorium Kimia, Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Instrumen Prodi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu*), oven (*Yenaco Drying Oven*), waterbath (*Biobase*), neraca analitik (*Ohaus*), blender (*philips*), toples kaca, mikropipet (*Dragon lab*), yellow tip, pisau, rak tabung reaksi, pipet tetes, corong (*Pyrex*), kuvet (*Helma*), tabung reaksi (*Iwaki*), gelas beaker (*Pyrex*), gelas ukur (*Pyrex*), erlenmeyer (*Pyrex*), batang pengaduk, dan labu ukur 5, 10, 25 dan 100 mL.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Rimpang temu blenyeh, rimpang kunyit, etanil 96%, HCl encer, metanol, serbuk magnesium, HCl pekat, asam asetat glacial, aquadest, n-butanol, amoniak, HCl 2M, reagen mayer, reagen dragendrof, etil asetat, pereaksi dragendrof, FeCl₃ 1%, FeCl₃ 5%, anisaldehyd-asam sulfat, pereaksi lieberman-burchard, asam asetat

anhidrat, H₂SO₄ pekat, n-heksan, serbuk kuersetin, metanol p.a, serbuk ABTS, kalium persulfat, lempeng KLT dan kertas saring.

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental untuk mengetahui aktivitas antioksidan kombinasi rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Bl) dan rimpang kunyit (*Curcuma longa* L) dengan metode ABTS.

3.3.2 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu kombinasi ekstrak rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Bl) dan rimpang kunyit (*Curcuma longa* L).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak etanol rimpang temu blenyeh dan rimpang kunyit dengan metode ABTS.

3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu tempat pengambilan sampel, jenis sampel, suhu ekstraksi, tempat penelitian, metode, jenis pelarut, cara pembuatan dan uji yang dilakukan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi S1 Universitas Bhamada Slawi.

3.4.2 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan yaitu rimpang temu blenyeh dan rimpang kunyit yang didapat dari Wisata Kesehatan Jamu, Kalibakung, Kabupaten Tegal. Rimpang temu blenyeh dan rimpang kunyit sebanyak 5 kg. Dimana rimpang temu blenyeh dan rimpang kunyit segar dilakukan sortasi basah, kemudian dicuci dengan air yang mengalir dan ditiriskan lalu diiris tipis dengan ketebalan sekitar 0,3 cm. Selanjutnya dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60°C sampai kadar airnya kurang dari 10%, setelah simplisia sudah kering kemudian dilakukan sortasi kering lalu ditimbang simplisia kering dan haluskan dengan menggunakan blender hingga menjadi serbuk (Larasati & Jusnita, 2020).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak

Serbuk rimpang temu blenyeh dan serbuk rimpang kunyit masing-masing ditimbang sebanyak 500 gram dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 2.000 mL selama 3 hari. Setiap 24 jam sekali dilakukan pengadukan, kemudian hasil maserasi dilakukan penyaringan residu dan didapatkan filtrat hasil perendaman. Filtrat yang didapat lalu di ekstraksi menggunakan *waterbath* dengan suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental, jika sudah mendapatkan

ekstrak kental lalu ekstrak yang diperoleh disimpan pada wadah tertutup rapat (Afifah dkk., 2023). Hasil perolehan rendemen dihitung dengan persamaan:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak (g)}}{\text{Bobot serbuk simplisia (g)}} \times 100\%$$

(Samodra dkk., 2023)

3.4.4 Uji Parameter Ekstrak

a. Pengujian Parameter Spesifik

1. Pemeriksaan Organoleptik

Ditimbang masing-masing ekstrak rimpang temu blenyeh dan kunyit sebanyak 1 gram dimasukkan kedalam cawan porselin kemudian diamati menggunakan panca indera untuk mendeskripsikan meliputi bentuk, warna, bau dan rasa lalu dicatat hasilnya (Maryam dkk., 2020).

b. Pengujian Parameter Non Spesifik

1. Pengujian Kadar Air

Ekstrak etanol rimpang temu blenyeh dan kunyit ditimbang sebanyak 0,5 gram diletakkan pada piring aluminium *moisture analyzer* diatur pada temperatur 105°C sehabis itu ditutup dan secara otomatis pemanas halogen menyala serta mulai memanaskan ekstrak hingga berat ekstrak menjadi konstan. Berat ekstrak dikatakan konstan bila lampu halogen mati serta hasil kandungan air

telah muncul. Ketentuan kualitas kandungan air pada ekstrak ialah $\leq 10\%$.

(Depkes RI, 2000).

2. Pengujian Susut Pengeringan

Ditimbang ekstrak sebanyak 1 gram dan diratakan pada botol timbang tertutup yang sudah dipanaskan pada suhu 105°C dengan waktu 30 menit. Masukkan kedalam oven dibuka tutupnya, keringkan pada suhu 105°C dalam waktu 30 menit dan dikeluarkan. Didinginkan dalam desikator lalu ditimbang dan dihitung persentasenya. Menghitung susut pengeringan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Susut pengeringan} = \frac{A - B}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A = Botol timbang + sampel sebelum di panaskan (g)

B = Botol timbang+ sampel setelah dipanaskan (g)

(Depkes

RI, 2017).

3. Penetapan Kadar Abu Total

Ditimbang ekstrak sebanyak 1 gram dimasukkan dalam krus porselin yang sebelumnya sudah ditimbang. Selanjutnya mengarangkan di atas pijar dan diabukan dalam tanur dengan suhu 600°C selama 30 menit sampai menjadi abu. Kemudian didinginkan dengan desikator dan ditimbang

berat abu. Kadar abu total ditentukan oleh persen berat yang digunakan. Menghitung kadar abu total dengan rumus:

$$\% \text{ Kadar abu} = \frac{W2 - W0}{W1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = Berat krus kosong (g)

W1 = Berat ekstrak awal (g)

W2 = Berat krus + berat ekstrak setelah di abukan (g)
(Depkes

RI, 2017)

4. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang didapat dari penetapan kadar abu total, dididihkan dengan HCl encer sebanyak 25 mL selama 5 menit. Bagian yang tidak larut asam dikumpulkan dan disaring dengan kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas kemudian disaring, lalu dipijarkan dalam krus dengan suhu 600°C selama 30 menit. Abu tersebut di dinginkan dalam desikator dan dilakukan penimbangan. Selanjutnya, dilakukan perhitungan antara kadar abu tidak larut asam menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{W2 - (C \times 0,0076) - W0}{W1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 : Berat cawan kosong (g)

W1 : Berat ekstrak+cawan (g)

W2 : Berat cawan+abu yang tidak larut asam (g)

C : Bobot kertas saring (g)

(Rahmaniati dkk., 2018)

3.4.5 Skrining Fitokimia

Berikut ini beberapa skrining fitokimia yaitu uji fitokimia menggunakan metode reaksi warna dan uji penegasan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) meliputi senyawa flavonoid, senyawa alkaloid, senyawa tanin, senyawa saponin dan senyawa triterpenoid dan steroid.

1. Uji Senyawa Flavonoid

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,1 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian diuapkan sampai kering. Ditambahkan 1-2 mL metanol panas 50%, kemudian ditambahkan logam Mg dan ditambahkan 4-5 tetes HCl pekat. Hasil positif larutan berwarna merah atau jingga menunjukkan adanya flavonoid (Pramiastuti & Murti, 2022).

Uji penegasan untuk senyawa flavonoid dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dengan cara menotolkan masing-masing ekstrak pada fase diam silica gel 60 F₂₅₄, selanjutnya dielusikan dengan fase gerak asam asetat glacial : air : n-butanol (1:5:4) dengan penampak noda uap amoniak. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna kuning, biru atau hijau (Yuda dkk., 2017).

2. Uji Senyawa Alkaloid

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,1 gram, ditambahkan 0,5 mL HCl 2M, bagi larutan menjadi 2 tabung. Tabung 1 tambahkan 2-3 tetes reagen mayer dan tabung 2 tambahkan 2-3 tetes reagen

dragendroff. Hasil positif terbentuk endapan berwarna merah bata, merah, dan jingga (reagen dragendroff) dan terdapat endapan putih atau kekuningan (reagen mayer) menunjukkan adanya alkaloid (Pramiastuti & Murti, 2022).

Uji penegasan untuk senyawa alkaloid dengan kromatografi lapis tipis dengan cara menjenuhkan fase gerak yang digunakan etil asetat : metanol : air (200:23,5:10) kemudian masing-masing ekstrak ditotolkan pada fase diam silica gel 60 F₂₅₄. Plat KLT dikeringkan lalu dideteksi dibawah sinar UV 254 dan 366 nm, kemudian disemprotkan dengan penampak noda menggunakan pereaksi dragendorf. Hasil positif adanya alkaloid terbentuknya noda berwarna biru atau kuning (La dkk., 2020).

3. Uji Senyawa Tanin

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1-2 tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif apabila terbentuk larutan hijau kehitaman atau biru tua menunjukkan adanya tanin (Pramiastuti & Murti, 2022).

Uji penegasan untuk senyawa tanin dengan kromatografi lapis tipis dengan cara menjenuhkan fase gerak yang digunakan yaitu metanol : air (6:4) kemudian masing-masing ekstrak ditotolkan pada fase diam silica gel 60 F₂₅₄. Plat KLT dikeringkan lalu dideteksi dibawah sinar UV 254 dan 366 nm, kemudian disemprotkan dengan penampak noda FeCl₃ 5%.

Hasil positif adanya tanin terbentuknya noda berwarna bintik hitam (Yuda dkk., 2017).

4. Uji Senyawa Saponin

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram ditambahkan dengan 10 mL aquadest masukkan dalam tabung reaksi kemudian dikocok kuat selama 10 detik sampai muncul busa Hasil positif apabila terdapat busa kurang lebih 1 cm (Ningsih dkk., 2020).

Uji penegasan untuk senyawa saponin dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dengan cara menjenuhkan fase gerak yang digunakan yaitu n-butanol : air (1:1) kemudian masing-masing ekstrak ditotolkan pada fase diam gel 60 F₂₅₄. Plat KLT dikeringkan lalu dideteksi dibawah sinar UV 254 dan 366 nm, kemudian disemprotkan dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat. Hasil positif adanya saponin terbentuknya noda berwarna merah, kuning, biru tua, ungu, hijau tua atau kuning kecoklatan (Wardhani & Sulistyani, 2019).

5. Uji Senyawa Terpenoid dan Steroid

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya ditambahkan 1 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung. Hasil positif triterpenoid apabila terbentuk warna ungu atau merah dan hasil positif steroid apabila terbentuk warna hijau (Ningsih dkk., 2020).

Uji penegasan untuk senyawa terpenoid dan steroid masing-masing dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dengan cara menjenuhkan fase gerak n-heksan : etil asetat (7:3) dan n-heksan : etil asetat (1:4) kemudian masing-masing ekstrak ditotolkan pada fase diam gel 60 F₂₅₄. Plat KLT dikeringkan lalu dideteksi dibawah sinar UV 254 dan 366 nm, kemudian disemprotkan dengan penampak noda lieberman-burchard. Hasil positif adanya senyawa triterpenoid terbentuknya noda berwarna biru, hijau, kuning, coklat & merah-violet sedangkan steroid ditunjukkan berwarna hijau-biru (La dkk., 2020).

3.4.5 Penentuan Aktivitas Antioksidan Metode ABTS

a. Pembuatan Larutan standar Pembanding Kuersetin

Membuat larutan kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm dengan menimbang 10 mg serbuk kuersetin, larutkan dengan menggunakan metanol p.a dengan labu ukur 100 mL. Selanjutnya larutan baku 100 ppm dipipet masing-masing 0,25, 0,5, 0,75, 1, dan 1,25 mL dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan dengan metanol p.a sampai tanda batas sehingga didapatkan seri konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm (Sari, 2022).

b. Pembuatan Larutan

1. Larutan ABTS

Ditimbang sebanyak 18 mg ABTS (7 mM) dilarutkan dengan aquadest 5 mL dalam labu ukur (Wicaksono dkk., 2021).

2. Larutan $K_2S_2O_8$

Ditimbang kalium persulfat sebanyak 3,5 mg kemudian dilarutkan dengan aquadest kedalam labu ukur sebanyak 5 mL (Saputri dkk., 2020).

3. Larutan Stok ABTS

Larutan ABTS sebanyak 5 mL ditambahkan dengan 5 mL kalium persulfat kemudian ditambahkan aquadest sampai 25 mL lalu diinkubasi dalam ruang gelap selama 12-16 jam hingga dihasilkan dengan warna biru gelap (Saputri dkk., 2020).

c. Penentuan Panjang Gelombang ABTS

Larutan stok ABTS diambil sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan dicukupkan dengan aquadest sampai tanda batas. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang dari 400-800 nm hingga diperoleh panjang gelombang maksimum (Saputri dkk., 2020).

d. Penentuan *Operating Time*

Larutan standar kuersetin 15 ppm diambil 1 mL ditambahkan 2 mL larutan stok ABTS. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum hingga diperoleh

absorbansi yang stabil (Wicaksono dkk., 2021). Pada penentuan *operating time* larutan diukur absorbansinya dengan interval waktu 2 menit selama 30 menit (Devi dkk., 2022).

e. Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Baku Pembanding Kuersetin

Larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm masing-masing konsentrasi diambil sebesar 1 mL kemudian ditambah 2 mL larutan stok ABTS, larutan diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh dan diukur serapan menggunakan metode spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Sari, 2022).

f. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol

1. Ekstrak Rimpang Temu Blenyeh

Ekstrak sebanyak 25 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 25 mL sebagai larutan ekstrak 1000 ppm. Masing-masing, larutan ekstrak dipipet sebanyak 0,25, 0,5, 0,75, 1 dan 1,25 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas hingga diperoleh konsentrasi 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm. Masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan 2 mL larutan stok ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai tanda batas dengan metanol p.a. Selanjutnya larutan diinkubasi selama *operating time* yang

diperoleh dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan (Afifah dkk., 2023).

2. Ekstrak Rimpang Kunyit

Ekstrak sebanyak 25 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 25 mL sebagai larutan ekstrak 1000 ppm. Masing-masing, larutan ekstrak dipipet sebanyak 0,25 mL, 0,5 mL, 0,75 mL, 1 mL dan 1,25 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas hingga diperoleh konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm. Masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan 2 mL larutan stok ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai tanda batas dengan metanol p.a. Selanjutnya larutan diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan (Afifah dkk., 2023).

3. Kombinasi Ekstrak Rimpang Temu Blenyeh dan Rimpang Kunyit

Kombinasi dibuat dengan perbandingan (1:1), (1:2) dan (2:1) kemudian masing-masing kombinasi dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 25 mL sebagai larutan ekstrak kombinasi 1000 ppm. Masing-

masing larutan ekstrak kombinasi dipipet sebanyak 0,25 mL, 0,5 mL, 0,75 mL, 1 mL dan 1,25 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas hingga diperoleh seri konsentrasi 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm. Selanjutnya masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL dimasukkan dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan 2 mL larutan stok ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai tanda batas dengan metanol p.a. Selanjutnya larutan diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan (Samodra dkk., 2023).

Tabel 3. 1 Perbandingan Volume Kombinasi Ekstrak Etanol Rimpang Temu Blenyeh dan Rimpang Kunyit

Perbandingan Kombinasi Rimpang Temu Blenyeh dan Rimpang kunyit	Rimpang Temu Blenyeh (mg)	Rimpang Kunyit (mg)
1:1	12,5	12,5
1:2	8,3	16,7
2:1	16,7	8,3

3.5 Analisa Data

a. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan dari hasil pengujian ekstrak etanol rimpang temu blenyeh tunggal, ekstrak etanol rimpang kunyit tunggal dan ekstrak kombinasi rimpang temu blenyeh dan rimpang kunyit

dengan metode ABTS dihitung sebagai % inhibisi menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

b. Perhitungan Nilai IC₅₀

Perhitungan nilai IC₅₀ melalui persamaan regresi linier $y = bx + a$ antara konsentrasi dari larutan yang akan diuji (x) dengan % inihibisi (y), perhitungan IC₅₀ ditulis dengan sebagai berikut (Wicaksono dkk., 2021):

$$y = 50$$

$$y = bx + a$$

$$50 = bx + a$$

$$X = \frac{50 - a}{b} = \text{IC}_{50}$$

c. Pengolahan Data dan Analisis Data

Analisis data dilakukan pada panjang gelombang maksimum pada spektrofotometer UV-Vis sehingga nilai berupa absorbansi. Setelah didapatkan nilai absorbansi maksimum, sampel kemudian dihitung total antioksidan menggunakan metode kurva standar dari regresi linier $y = bx + a$ kemudian data diolah dengan menggunakan microsoft excel. Data yang terkumpul selanjutnya dilakukan uji homogenitas dan normalitas menggunakan aplikasi SPSS, kemudian dilanjutkan dengan menggunakan uji ANOVA untuk menguji perbedaan seri larutan konsentrasi dari sampel rimpang temu blenyeh dan rimpang kunyit terhadap nilai IC₅₀ antioksidan (Samodra dkk., 2023).