BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di bulan Februari-Juli 2025 bertempat di laboratorium bahan alam dan laboratorium kimia farmasi Program Studi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu oven (Drawell), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), timbangan analitik (Ohaus), *waterbath* (Memmert), *moisture balance* (Ohaus), desikator, kompor listrik (Maspion), blender (Philips), seperangkat alat gelas (Pyrex), cawan porselen (Sentana), toples kaca, cawan porselen (Sentana), penjepit kayu, mikropipet, kertas saring, batang pengaduk (Pyrex), pipet tetes (Onemed), pipet ukur (Pyrex), saringan, kain, *alumunium foil*, kertas label, dan alat tulis.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ialah jahe merah, lengkuas merah, aquadest, HCl pekat, HCl 2 N, etanol, metanol, pereaksi mayer, pereaksi dragendrof, pereaksi wagner, kalium persulfate, etanol 96%, $FeCl_3$, serbuk magnesium, NaOH, NaCl, kuersetin, serbuk ABTS, kloroform, natrium klorida, kalium klorida, natrium hidrogen fosfat.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dilakukan pengujian aktivitas antioksidan kombinasi esktrak jahe merah dan lengkuas merah dengan metode ABTS. Tahap pertama adalah pengumpulan sampel rimpang jahe merah dan lengkuas merah, tahap selanjutnya adalah pembuatan simplisia. Kemudian dilakukan ekstraksi simplisia rimpang jahe merah dan lengkuas merah dengan pelarut etanol 96% sehingga diperoleh ekstrak jahe merah dan lengkuas merah. Ekstrak dipekatkan dengan *waterbath* dengan suhu 60ºC selama 30 menit sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian diuji aktivitas antioksidannya untuk ditentukan nilai IC_{50}.

3.3.1 Variabel Bebas (Independent Variable)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale* var. rubrum) dan lengkuas merah (*Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum).

3.3.2 Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale* var. Rubrum) dan lengkuas merah (*Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum) dengan metode ABTS.

3.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah cara ekstraksi, cara maserasi dan cara pengujian aktivitas antioksidan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran identitas tanaman yang akan digunakan dan menghindari kesalahan dalam pengambilan bahan. Bahan baku dalam penelitian ini menggunakan jahe merah yang diperoleh dari Desa Sumurpanggang, Kecamatan Margadana, Kota Tegal. Determinasi dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.4.2 Pembuatan Serbuk Simplisia

Jahe merah dan lengkuas merah masing-masing diambil sebanyak 5 kg. Tahap awal yang dilakukan pembuatan serbuk simplisia yaitu dilakukan sortasi basah. Setelah kering lakukan perajangan pada jahe merah dan lengkuas merah, kemudian diangin-anginkan dan lanjutkan dengan di oven pada suhu 50ºC selama 24 jam. Kemudian dilakukan sortasi kering. Selanjutnya dihaluskan menggunakan blender, serbuk simplisia dimasukkan ke dalam toples kaca dan ditutup rapat (Azizah, 2023).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak Jahe Merah dan Lengkuas Merah

Ekstrak jahe merah dan lengkuas merah diperoleh dari proses ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi (Tjandra et al., 2020). Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam masing-masing serbuk

rimpang jahe merah dan lengkuas merah sebanyak 500 g dengan 2500 mL (1:5) etanol 96% didalam toples kaca serta disimpan ditempat yang terlindung dari paparan cahaya matahari secara langsung (Tangkau et al., 2023). Sampel direndam selama 3 x 24 jam, pengadukan dilakukan setiap 24 jam sekali selama 15 menit (Afifah et al., 2023). Kemudian disaring dan maserat yang diperoleh diuapkan dengan *waterbath* dengan suhu 60ºC selama 3 hari hingga diperoleh ekstrak kental jahe merah dan lengkuas merah.

Rendemen ekstrak etanol dapat dihitungan dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak (g)}}{\text{Berat simplisia (g)}} \text{ x } 100\%$$

3.4.4 Uji Parameter Ekstrak

a. Pengujian Parameter Spesifik

1. Uji Organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan untuk mendapatkan hasil dari ekstrak yang meliputi warna, bau, rasa, dan bentuk (Pine et al., 2023).

b. Pengujian Parameter Non Spesifik

1. Susut Pengeringan

Ekstrak ditimbang sebanyak 1 g kemudian dipanaskan sampai 30 menit pada suhu 105ºC dan ditempatkan dalam krus porselen yang telah ditarer. Sebelum ditimbang, ekstrak

dihaluskan dengan mengocok kurs porselen sampai membentuk lapisan setebal 5-10 mm. Masukkan kedalam oven, buka tutupnya dan keringkan pada suhu 105ºC sampai beratnya tertahan. Dinginkan dengan desikator (Pine et al., 2023).

Perhitungan kadar air dalam % menggunakan rumus sebagai berikut (Veninda et al., 2023) :

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

Keterangan :
A = Botol timbang + sampel sebelum dipanaskan (g)
B = Botol timbang + sampel setelah dipanaskan (g)

2. Kadar Air

Uji kadar air dilakukan dengan menggunakan alat *moisture analyzer balance*. Langkah pertama yaitu letakkan sampel di atas pan sebanyak 0,5 g. Kemudian tutup bagian cover alat dan tekan tombol mulai untuk memulai pengukuran kadar air selama 10 menit. Ketika alat mengeluarkan bunyi menandakan kadar air sampel telah konstan (Supriningrum et al., 2021).

3. Kadar Abu

a. Kadar Abu Total

Penetapan kadar abu total dilakukan dengan cara sebanyak 1 g ekstrak ditimbang, dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara. Dipijarkan hingga habis pada suhu 600ºC selama 30 menit kemudian didinginkan, ditimbang. Jika cara ini tidak dapat

menghilangkan arang, ditambahkan air panas, disaring abu menggunakan kertas saring. Dipijarkan sisa dan kertas saring dalam krus yang sama. Dimasukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, dipijarkan hingga bobot tetap, lalu ditimbang. Dihitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Supriningrum et al., 2021).

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

Keterangan:
W0 = Bobot krus kosong (g)
W1 = Bobot krus awal (g)
W2 = Bobot krus + ekstrak setelah di abukan (g)

b. Uji Kadar Abu Tidak Larut Asam

Didihkan abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit. Kumpulkan bagian yang tidak larut asam, saring melalui kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijarkan dalam krus hingga bobot tetap pada suhu 600ºC. Kadar abu yang tidak larut asam dihitung terhadap berat bahan uji (Supriningrum et al., 2021).

$$\text{Kadar Abu Tidak Larut Asam} = \frac{W3-(C \times 0{,}0076)-W0}{W1} \times 100\%$$

Keterangan :
W0 = Bobot krus kosong (g)
C = Bobot kertas saring (g)
W1 = Bobot ekstrak awal (g)
W3 = Bobot krus + abu yang tidak larut asam (g)

3.4.5 Skrining Fitokimia Ekstrak

Uji skrining fitokimia yang dilakukan yaitu :

1. Uji Senyawa Flavonoid

   Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan dengan 5 mL etanol dan dipanaskan selama ± 5 menit didalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah 3 tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 g bubuk magnesium. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua (magenta) menunjukkan senyawa flavonol/flavonon, endapan merah menunjukkan senyawa flavon, dan endapan hijau menunjukkan senyawa glikosida/aglikon (Khasanah et al., 2020).

2. Uji Senyawa Alkaloid

   Ekstrak sebanyak 0,5 g ditambah 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dipakai untuk tes alkaloida. Diambil 3 tabung reaksi lalu ke dalam masing-masing tabung reaksi dimasukkan 0,5 mL filtrat. Pada masing-masing tabung pereaksi mayer, warna merah jingga pada perekasi dragendrof dan terbentuk endapan pada penambahan pereaksi wagner (Azizah, 2023).

3. Uji Senyawa Tanin

   Sebanyak 0,5 g ekstrak yang telah diencerkan dengan aquadest dimasukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan beberapa tetes larutan $FeCl_3$. Jika terjadi perubahan warna menjadi warna hijau-

biru, hitam-hijau, atau biru-hitam menunjukkan adanya senyawa tanin (Tangkau et al., 2023).

4. Uji Senyawa Saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan dengan air hangat lalu dikocok selama 30 menit. Dilihat busa dan diukur berapa cm busa yang terbentuk. Dibiarkan selama 10 menit jika busanya tidak hilang ditambahkan HCl pekat. Apabila masih terdapat busa yang konstan maka menunjukkan hasil positif (Khasanah et al., 2020).

5. Uji Senyawa Triterpenoid

Ekstrak sebanyak 0,5 g dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL kloroform dan disaring. Filtrat ditambahkan 1 tetes asam asetat anhidrat dan 2 tetes asam sulfat pekat dan dikocok. Terbentuknya warna merah mengindikasikan positif triterpenoid (Tangkau et al., 2023).

3.4.6 Penentuan Aktivitas Antioksidan Metode ABTS

a. Pembuatan Larutan Baku Pembanding Kuersetin

Serbuk kuersetin ditimbang sebanyak 10 mg, larutkan dengan metanol p.a dan dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL sehingga didapatkan konsentrasi 100 ppm. Larutan baku kerja kuersetin dibuat dari larutan baku 100 ppm dengan cara deret konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm yang dipipet masing-masing sebanyak 0,25; 0,5; 0,75; 1; dan 1,25 mL dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas (Aini et al., 2023).

b. Pembuatan Larutan ABTS

Serbuk ABTS (7 mM) ditimbang sebanyak 18 mg, dilarutkan dengan aquadest dalam labu ukur 5 mL (Aini et al., 2023).

c. Larutan $K_2S_2O_8$

Ditimbang kalium persulfat (2,45 mM) sebanyak 16 mg kemudian dilarutkan dengan aquadest ke dalam labu ukur sebanyak 25 mL (Afifah et al., 2023).

d. Larutan Stok ABTS

Campurkan larutan ABTS 5 mL dengan larutan kalium persulfat 5 mL kemudian ditambahkan aquadest sampai 25 mL lalu diinkubasi di inkubator dalam ruang gelap pada suhu ruang 22-24ºC selama 12-16 jam sebelum digunakan. Larutan siap digunakan ditandai dengan warna biru gelap (Riyani et al., 2022).

e. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum

Larutan stok ABTS diambil sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan dicukupkan dengan metanol p.a sampai tanda batas. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang dari 400-800 nm hingga diperoleh panjang gelombang maksimum (Azizah, 2023).

f. Penentuan *Operating Time*

Larutan standar kuersetin 15 ppm diambil 0,1 mL ditambahkan 2 mL larutan stok ABTS. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum hingga diperoleh absorbansi yang stabil.

Pada penentuan *operating time* larutan diukur absorbansinya dengan interval waktu 2 menit selama 30 menit (Sari, 2022).

g. Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Baku Pembanding Kuersetin

Larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm masing-masing konsentrasi diambil 1 mL dan ditambah 2 mL larutan stok ABTS kemudian larutan diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh dan diukur serapan menggunakan metode spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Azizah, 2023).

h. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Jahe Merah dan Lengkuas Merah dengan Metode ABTS

1. Ekstrak Jahe Merah

Larutan stok 1000 ppm disiapkan dengan cara ditimbang 25 mg ekstrak jahe merah dan dilarutkan dengan metanol p.a sambil di homogenkan. Volume akhir dicukupkan dengan metanol p.a sampai 25 mL dalam labu ukur. Masing-masing larutan ekstrak dipipet sebanyak 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5 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 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 et al., 2023).

2. Ekstrak Lengkuas Merah

   Larutan stok 1000 ppm disiapkan dengan cara ditimbang 25 mg ekstrak lengkuas merah dan dilarutkan dengan metanol p.a sambil di homogenkan. Volume akhir dicukupkan dengan metanol sampai 25 mL dalam labu ukur. Masing-masing larutan ekstrak dipipet sebanyak 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5 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 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 et al., 2023).

3. Kombinasi Ekstrak Jahe Merah dan Lengkuas Merah

   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 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5 mL. Kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas labu ukur 10 mL, hingga diperoleh konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm (Samodra et al., 2023).

Larutan sampel pada masing-masing konsentrasi tersebut dipipet sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan 2 mL larutan stok ABTS. Kemudian 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 et al., 2023).

Tabel 3.1 Perbandingan Ekstrak Jahe Merah dan Lengkuas Merah (Samodra et al., 2023)

Perbandingan Kombinasi Jahe Merah dan Lengkuas Merah	Jahe Merah (mg)	Lengkuas Merah (mg)
1:0	25	-
0:1	-	25
1:1	12,5	12,5
1:2	8,3	16,7
2:1	16,7	8,3

i. Inhibisi (%)

Parameter yang biasa digunakan untuk menginterpretasikan hasil dari uji aktivitas antioksidan dengan metode ABTS adalah dengan nilai IC_{50}, yaitu konsentrasi yang menyebabkan hilangnya 50% aktivitas ABTS. Untuk menghitung nilai IC_{50} diperlukan data

persen inhibisi dari pengujian yang dilakukan. Persen inhibisi dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Tangkau et al., 2023).

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Abs Blanko-Abs Sampel})}{\text{Abs Blanko}} \text{ x } 100\%$$

j. Penetapan IC_{50}

Perhitungan nilai IC_{50} (*Inhibitor Concentration* 50%) menunjukkan besarnya konsentrasi senyawa larutan uji yang mampu meredam proses oksidasi sebesar 50%, melalui persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi larutan uji (x) dengan % inhibisi sebesar 50% dan x sebagai IC_{50}. Perhitungan nilai IC_{50} dapat dituliskan dengan cara mengubah y=50 (Afifah et al., 2023).

$$y = bx + a$$

$$50 = bx + a$$

$$x = \frac{50-a}{B} \equiv IC_{50}$$

Keterangan :

y = % Inhibisi
x = Konsentrasi sampel (ppm)
b = Gradien atau kemiringan garis dari persamaan regresi linear
a = Intersep (titik potong sumbu y) dari persamaan regresi linear
IC_{50} = Konsentrasi sampel yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas sebesar 50%

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengukuran nilai IC_{50} terhadap ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale* var. rubrum) dan lengkuas merah (*Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum) menggunakan spektrofotometri UV-Vis dianalisis dengan bantuan SPSS 25. Uji normalitas dilakukan dengan metode *Shapiro-Wilk*, di mana jika nilai signifikansi >0,05 maka data dianggap terdistribusi normal. Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas dengan *Levene test* jika nilai signifikansi >0,05, maka data dianggap homogen. Kemudian, analisis dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Jika nilai signifikansi yang diperoleh >0,05, maka H0 diterima dan H1 ditolak sedangkan jika nilai signifikansi <0,05, H0 ditolak. Sebagai langkah akhir, dilakukan uji *post hoc*. Uji *post hoc* dilakukan untuk melihat perbedaan bermakna antar kelompok sampel setelah uji *One Way Anova* menunjukkan hasil yang signifikan.