

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi, Program Studi Farmasi S-1 Universitas Bhamada Slawi pada bulan Januari hingga Maret tahun 2025

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi *Spektrofotometer UV-Vis mini-1240 (Shimadzu)*, *waterbath (DFS)*, *moisture analyzer*, timbangan analitik (Oshaus), tabung reaksi (*pyrex*), labu ukur (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), *Erlenmeyer (pyrex)*, corong (*pyrex*), batang pengaduk, kaca arloji (*pyrex*), gelas *beaker (pyrex)*, dan pipet tetes, rak tabung reaksi, cawan porselen, kertas saring, *plastic wrapping*, aluminium foil, *micropipette*.

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang dan daun temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume), etanol 96% (teknis), CuCl_2 , *aquades*, ammonium asetat, larutan *neocuproine* (Nc), kuersetin, *β -caroten bleaching*, asam lenoleat, tween 80, HCl 2%, reagen mayer, HCl pekat, HCl 1N, metanol, FeCl_3 , asam asetat anhidrat, H_2SO_4 .

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang bersifat analitik dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol rimpang dan daun temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) dengan tujuan untuk mengetahui berapa nilai IC_{50} aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol rimpang dan daun temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume).

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi rimpang dan daun temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai IC_{50} aktivitas antioksidan ekstrak etanol rimpang dan daun temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume).

3.3.3 Variabel Terkendali

Variable terkontrol dalam penelitian ini adalah proses lama waktu maserasi rimpang dan daun temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) dan suhu inkubasi pengujian aktivitas antioksidan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Pemeriksaan atau determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Bhamada Slawi. Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran tanaman yang akan digunakan dalam penelitian ini.

3.4.2 Penyiapan Sampel

Pada pembuatan simplisia yang dilakukan yaitu mengumpulkan bahan baku tanaman temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume). Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini meliputi rimpang dan daun temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) yang diperoleh dari Wisata Kesehatan Jamu (WKJ) Kalibakung Kab. Tegal dalam keadaan segar kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran, bahan-bahan asing atau bagian yang rusak. Kemudian dicuci dengan air bersih kemudian ditiriskan. Pencucian dilakukan sebanyak tiga kali, agar seluruh bagian tumbuhan bersih dari pengotor. Setelah itu daun diletakan diatas kertas putih dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dalam kondisi suhu ruang (tidak terpapar sinar matahari langsung) hingga kandungan air berkurang sebanyak 10% (± 2 hari) (U. Khasanah, 2021).

Kemudian dipotong kecil lalu dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60 °C selama 3 hari. Setelah kering dilakukan sortasi kering untuk memisahkan pengotor yang ikut serta dalam proses pengeringan. Simplisia kering rimpang dan daun temu blenyeh dihaluskan sehingga didapatkan serbuk simplisia (U. Khasanah, 2021).

$$\% \text{ Rendemen simplisia} = \frac{\text{berat simplisia kering (g)}}{\text{berat simplisia basah (g)}} \times 100\%$$

3.4.3 Pembuatan Ekstrak

Simplisia rimpang dan daun temu blenyeh dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan (1:3). Ekstraksi dilakukan selama 72 jam dan dilakukan pengadukan sesekali (Saputri *et al.*, 2023). Ekstrak dipisahkan dengan pelarut atau disaring menggunakan *corong buchner* dan diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu 60°C untuk mendapatkan ekstrak kental rimpang dan daun temu blenyeh. Nilai rendemen ekstrak dapat dihitung menggunakan rumus (Mangirang *et al.*, 2019) :

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

3.4.4 Skrining Fitokimia

Dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa pada rimpang dan daun temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume), uji ini merupakan uji kualitatif. Pengujian fitokimia meliputi uji alkaloid, uji flavonoid, uji saponin, uji terpenoid dan steroid.

1. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan HCl 2%. Kemudian dikocok sampai benar-benar tercampur. Setelah itu disaring dan ditambahkan pereaksi dragendroff 3-4 tetes. Apabila terbentuk

endapan kuning-merah menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid (Ulfa, 2016).

2. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dengan penambahan pereaksi H_2SO_4 dilakukan dengan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan asam sulfat pekat H_2SO_4 . Setelah itu diamati pergantian warna yang berlangsung jika larutan berganti warna jadi merah tua ataupun kuning menunjukkan terdapatnya senyawa flavonoid (Shaikh & Patil, 2020).

3. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 10 mL air panas lalu dikocok selama 1 menit. Bila busa yang terbentuk tetap stabil selama 5 menit, maka ekstrak positif mengandung saponin (Lembang & Saleh, 2020).

4. Uji Steroid dan Triterpenoid

Sampel sebanyak 0,5 gram sampel dilarutkan dalam 0,5 mL asam asetat glasial dan 0,5 mL H_2SO_4 pekat. Sampel positif memiliki steroid bila tercipta warna biru atau jingga. Sampel positif pada triterpenoid yaitu terbentuk warna ungu dan jingga (Rumiyanti et al., 2019).

3.4.5 Uji Kromatografi Lapis Tipis

Identifikasi senyawa dilakukan dengan cara ekstrak kental rimpang dan daun temu blenyeh sebagai fase diam pada plat KLT GF₂₅₄ dan dalam wadah bejana (*chamber*) yang berisi fase gerak kloroform : metanol (1:3) dengan pembanding kuersetin untuk flavonoid, kloroform : metanol (1:4) dengan pembanding piperin untuk identifikasi alkaloid (Haniah, 2013), kloroform : aseton (4:1) dengan pembanding saponin untuk identifikasi saponin, sedangkan untuk triterpenoid dan steroid masing-masing menggunakan fase gerak n-heksan : etil asetat (17:3) dan n-heksan : etil asetat (1:4) (Sakinah, 2017). Kemudian biarkan fase gerak merambat sampai tanda batas, keluarkan plat KLT dan hasil elusi diamati dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm (Islamiyati and Saputri, 2018).

$$R_f : \frac{\text{jarak yang tempuh senyawa dari titik asal}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut dari titik asal}}$$

3.4.6 Uji Antioksidan Dengan Metode CUPRAC (*Cupric Ion Antioxidant Capacity*) dan β -Carotene Bleaching

1. Uji Antioksidan Dengan Metode CUPRAC

a) Pembuatan Dan Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ Maks) Reagen CUPRAC

Pada pembuatan reagen CUPRAC CuCl₂.2H₂O 0,01 M dibuat dengan cara menimbang 0,4262 gram, dilarutkan dalam labu ukur 25 mL *aquadest*. *Buffer* yang digunakan adalah ammonium asetat pH 7 yang dibuat dengan melarutkan 1,927 gram pada labu ukur 25 mL dengan

aquadest. Larutan *Neocupproine* 0,0075 M juga dibuat dengan melarutkan 0,039 gram pada labu ukur 25 mL dengan etanol 96% (Maryam et al., 2016). Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menambahkan 1 mL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, 1 mL *Neocupproine* 0,0075 M, 1 mL *Buffer* ammonium asetat, 1 mL etanol 96% dan 0,1 mL *aquadest* didalam vial dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-600nm (Haeria et al., 2018).

b) Penentuan Operating Time

Penentuan operating time dilakukan dengan cara larutan kuersetin konsentrasi 30 ppm diambil 1 mL, kemudian dimasukkan kedalam vial dan tambahkan masing-masing 1 mL larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, larutan *Neocupproine* 0,0075 M, larutan *Buffer* ammonium asetat, dan 0,1 mL *aquadest*. Kemudian larutan tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 2 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Saputri et al., 2023).

c) Pengukuran Larutan Blanko

Pengukuran blanko dengan cara mencampurkan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, *Buffer* ammonium asetat, etanol *p.a*

masing-masing 1 mL untuk dimasukan pada vial, 4 mL larutan *Neocupproine* 0,0075 M modifikasi dari jurnal dan ditambahkan 0,1 mL *aquadest*. Vial selanjutnya diinkubasi didalam suhu ruangan menyesuaikan hasil *operating time* yang didapatkan. Larutan CUPRAC yang sudah jadi dituangkan kedalam kuvet dan dibaca serapan maksimumnya pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 450 nm (Haeria et al., 2018).

d) Pengukuran Absorbansi Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding

Kontrol positif yang digunakan yaitu kuersetin dengan membuat larutan induk konsentrasi 1000 ppm. Larutan pengenceran seri konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm dan dimasukkan pada masing-masing labu ukur 10 mL kemudian dicukupkan volumenya dengan etanol 96% hingga tanda batas labu ukur 10 mL. Kemudian tambahkan masing-masing larutan konsentrasi dimasukkan 1 mL ke dalam vial dan ditambahkan masing-masing 1 mL larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, larutan *Neocupproine* 0,0075 M, *Buffer* ammonium asetat dan 0,1 mL *aquadest*, kemudian vial diinkubasi selama 30 menit (Haeria et al., 2018). Kemudian absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450 nm (Haeria et al., 2018).

e) Pengukuran Absorbansi Aktivitas Antioksidan Ekstrak

Sampel ekstrak etanol 96% rimpang dan daun temu blenyeh masing-masing dibuat larutan induk konsentrasi 1000 ppm. Larutan pengenceran seri konsentrasi yaitu 50, 75, 100, 125 dan 150 ppm untuk ekstrak etanol rimpang temu blenyeh, sedangkan konsentrasi 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm untuk ekstrak etanol daun temu blenyeh. Pengujian seri konsentrasi dari masing-masing ekstrak ditambahkan 1 mL sampel ke dalam vial dan ditambahkan masing-masing 1 mL larutan $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M, larutan *Neocupproine* 0,0075 M, *Buffer* ammonium asetat dan 0,1 mL *aquadest*, kemudian diinkubasi selama 30 menit (Haeria *et al.*, 2018). Kemudian absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450 nm (Haeria *et al.*, 2018).

2. Uji Antioksidan Dengan Metode β -Carotene Bleaching

a) Penyiapan Larutan Sampel Ekstrak dan Pembanding

Sampel ekstrak dan kuersetin terlebih dahulu disiapkan dalam bentuk larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan stok ini kemudian diencerkan secara bertahap menggunakan pelarut etanol untuk menghasilkan seri konsentrasi yang berbeda sesuai kebutuhan analisis. Untuk kuersetin sebagai pembanding standar, dibuat larutan dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Sementara

itu, untuk sampel ekstrak, dibuat seri konsentrasi sebesar 125, 150, 175, 200, dan 225 ppm. Pembuatan seri kadar ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada berbagai tingkat konsentrasi serta untuk menentukan nilai IC_{50} masing-masing sampel. (Bakti et al., 2017).

b) Pembuatan Emulsi β -caroten-linoleat dan Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum (λ maks)

Emulsi β -Carotene-linoleat dibuat dengan melarutkan 9 mg β -carotene dalam kloroform. Setelah kloroform diuapkan, elusi minyak dicampurkan dengan 30 mg asam linoleat dan 600 mg Tween-80. Campuran ini kemudian dilarutkan dalam 90 mL aquadest di atas stirrer dan diaduk hingga terbentuk emulsi β -carotene-linoleat. Untuk mendapatkan panjang gelombang maksimum, sebanyak 3 mL emulsi β -carotene-linoleat diukur, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 538 (Lutfiah, 2024).

c) Pembuatan Emulsi Asam Linoleat

Sebanyak 3,3 mg asam linoleat dicampurkan dengan 66,66 mg Tween-80, kemudian ditambahkan 10 mL aquadest diatas stirrer dan diaduk hingga terbentuk emulsi (Lutfiah, 2024).

d) Pembuatan Larutan Kontrol

Untuk menyiapkan kontrol, diambil 2 mL emulsi β -*carotene-linoleat* dan 2 mL etanol. Campuran ini kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 0 sampai 60 menit. Sebagai blanko, digunakan 2 mL emulsi asam linoleate (tanpa β -*carotene*) yang ditambahkan 0,2 mL etanol (Salamah & Nurushoimah, 2014).

e) Penentuan Waktu Inkubasi (*Operating Time*)

Diambil salah satu seri larutan sampel sebanyak 0,2 mL yang kemudian ditambahkan ke dalam 2 mL emulsi β -*carotene-linoleate*. Campuran ini diinkubasi di tempat gelap pada suhu 50°C selama 90 menit, dengan pengukuran serapan dilakukan setiap 15 menit. Inkubasi dihentikan ketika diperoleh serapan larutan β -*carotene-linoleat* yang stabil. Sebagai kontrol, diambil 2,0 mL emulsi β -*carotene-linoleat* dan ditambahkan 0,2 mL etanol (Salamah & Nurushoimah, 2014).

f) Penentuan Aktivitas Antioksidan

Larutan sampel dengan masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 0,2 mL, kemudian ditambahkan ke dalam 2,0 mL emulsi β -*carotene-linoleat*. Campuran tersebut diinkubasi ditempat gelap pada suhu 50°C selama 0 dan 60 menit. Serapan dibaca pada λ 460 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan perlakuan dilakukan

sebanyak 3 kali replikasi. Sebagai blanko, digunakan 2,0 mL larutan emulsi asam linoleat (tanpa β -carotene) yang ditambahkan dengan 2,0 mL sampel dengan konsentrasi yang sama dengan sampel yang sedang diukur serapannya (Lutfiah, 2024).

g) Analisis Hasil

Analisis hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode pemudaran β -carotene dilakukan dengan menghitung nilai presentase antioksidan. Aktivitas antioksidan sampel dihitung sebagai persen inhibisi relatif terhadap kontrol setelah diinkubasi selama t menit, menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas Antioksidan} = [1 - (A^0 - A^t) / (A_0^0 - A_t^0)] \times 100$$

Keterangan :

A_0 = absorbansi sampel waktu 0 menit

A_t = absorbansi sampel waktu t menit

A_0^0 = absorbansi kontrol waktu 0 menit

A_t^0 = absorbansi kontrol waktu t menit

(Salamah & Nurushoimah, 2014)

3.5 Analisis Data

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% rimpang dan daun temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) menggunakan metode CUPRAC dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* (IC_{50}) melalui regresi linear yang dimana menyatakan bahwa hubungan antara konsentrasi sampel uji (x) dengan aktivitas penangkapan radikal bebas berupa % inhibisi (y), diperoleh persamaan garis $y = bx + a$. Persamaan tersebut digunakan untuk

menyatakan nilai IC_{50} diperoleh dari nilai x setelah merubah $y = 50$, dapat dihitung menggunakan persamaan (Setiawan & Febriyanti, 2017) :

$$50 = b (IC_{50}) + a$$

Keterangan : b = Koefisien regresi/slop
 a = Intersep

Dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol rimpang dan daun temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) menggunakan metode β -Caroten Bleaching data hasil absorbansi dihitung persen penghambatan. Konsentrasi sampel dan persen penghambatan yang diperoleh diplot masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Persamaan tersebut untuk menentukan nilai IC_{50} dari sampel dengan nilai y sebesar 50 dan x yang akan diperoleh sebagai IC_{50} (Nurjanah et al., 2011)

