

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah model rancangan eksperimental. Penelitian eksperimental adalah pengujian yang dilakukan untuk mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang disebabkan oleh suatu faktor/perlakuan. Dalam hal ini yaitu guna membandingkan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dalam ekstrak jahe empurit berdasarkan perbedaan metode penyarian dan pelarut yang dipakai dalam proses penyarian. cara ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dan remaserasi, dimana masing-masing metode menggunakan pelarut etanol 96% dan etanol 70%.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Instrumen dan Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
- b. Determinasi tanaman dilakukan di Universitas Diponegoro Semarang tepatnya di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Jurusan Biologi Fakultas MIPA.

2. Waktu

Proses penelitian dilaksanakan pada periode September 2021 sampai Februari 2022.

C. Definisi Operasional

1. Rimpang Jahe Emprit

Salah satu jenis rimpang yang banyak dimanfaatkan untuk kebutuhan pengobatan herbal, bumbu masakan serta bahan baku minuman dan minuman. Jahe emprit mengandung beberapa zat metabolit sekunder seperti fenolik, flavonoid serta oleoresin (Sari, Darmanti, Hastuti 2006).

2. Metode Ekstraksi dan Pelarut

Metode ekstraksi adalah teknik yang digunakan dalam proses penyarian suatu zat dari campurannya. menggunakan suatu pelarut yang cocok (Mukhriani et al., 2014.). Target metabolit pada pengujian ini adalah flavonoid, proses penyarian menggunakan teknik maserasi dan remaserasi dengan pelarut etanol 96% dan 70%.

Maserasi memiliki prinsip yaitu suatu teknik penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam simplisia dalam satu atau campuran pelarut selama 3x24 jam pada temperatur kamar (25°C) dan terlindung dari cahaya (Butar-butur, 2019). Sedangkan remaserasi merupakan metode pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut pada suhu ruang dengan penggantian atau pengulangan pemberian pelarut terhadap simplisia yang sama setelah proses maserasi 3x24 jam selesai, untuk proses remaserasi berlangsung selama 1x24 jam (*pratiwi*, 2010).

Sedangkan pelarut sendiri merupakan zat yang berperan sebagai media untuk memisahkan zat tertentu dari suatu campuran. Pemilihan jenis

pelarut menyesuaikan dengan sifat kepolaran dari metabolit target. Pada pengujian ini dipilih pelarut etanol 70% dan 96% (Mubarak et al., 2018).

3. Flavonoid

Salah satu jenis senyawa yang sering ditemukan pada tumbuhan adalah flavonoid. Jenis-jenis flavonoid diantaranya flavonone, flavonol, flavon, kalkon, antosianin dll. Jenis-jenis tersebut didasarkan pada substitusi struktur masing-masing, yang mana setiap jenis memiliki peran farmakologis berbeda (Alfaridz & Amalia, 2018).

4. Antioksidan

Antioksidan yaitu senyawa yang mempunyai kemampuan memutus aktivitas radikal bebas atau dengan kata lain dapat bermanfaat untuk meminimalisir dampak negatif akibat dari aktivitas radikal bebas. Antioksidan dapat diperoleh dari bahan alam maupun diperoleh melalui suatu proses buatan (sintetik). Tetapi saat ini penggunaan antioksidan sintetik mulai dibatasi karena telah teridentifikasi memiliki potensi karsinogenik pada hewan uji (Chotimah, 2019).

5. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri menjadi salah satu metode dalam kimia analisis yang digunakan untuk menentukan komposisi suatu sampel baik secara kuantitatif dan kualitatif yang berdasarkan pada interaksi antara materi dengan cahaya. Penggunaan metode ini dapat dilakukan dalam proses penentuan kadar suatu senyawa (Warono & Syamsudin, 2013)(Andriani & Murtisiwi, 2018).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi yang digunakan dalam proses pengujian, dimana penulis menggunakan 2 (dua) perlakuan dalam proses ekstraksi yakni maserasi dan remaserasi dengan setiap metode menggunakan 2 macam pelarut yaitu etanol 96% dan 70% serta kadar ekstrak pada pengujian aktivitas antioksidan.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak jahe emprit.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah suhu pada setiap perlakuan, waktu/durasi ekstraksi serta volume pelarut dalam proses ekstraksi, tempat tumbuh tanaman jahe dan usia tanaman.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang dibutuhkan pada penelitian ini diantaranya toples kaca, Blender (Philips), , cawan porselin, ayakan mesh 40, *rotary evaporator* (Rotavapor® R-300), Oven, batang pengaduk, kain flanel, loyang, batang pengaduk, kuvet, tabung reaksi, labu ukur, Spektrofotometer UV-Vis (Shimazu), gelas beker, gelas ukur, pipet tetes, corong pisah, neraca analitik (Preeisa XB 220A), pisau dan bejana.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam pengujian ini diantaranya etanol 70%, rimpang segar jahe emprit, etanol 96%, Aquadest, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), asam galat, $AlCl_3$, asam asetat dan kuersetin

F. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman Jahe Emprit (*Zingiber var. Amarum*) dilakukan di Universitas Diponegoro Semarang tepatnya Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Jurusan Biologi Fakultas MIPA.

2. Proses Ekstraksi

a. Pengambilan dan Pengolahan Sampel

1) Kriteria sampel

a) Kriteria Inklusi

Sampel yang digunakan sebagai objek penelitian adalah rimpang jahe emprit yang dihasilkan dari hasil panen petani yang berada di daerah Temanggung Jawa Tengah. Kriteria lainnya adalah usia pemanenan rimpang berkisar antara 9-10 bulan sehingga kandungan metabolit dalam rimpang sudah cukup maksimal.

b) Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dalam pemilihan sampel adalah rimpang jahe emprit yang dijual di pasaran, artinya meskipun rimpang jahe yang beredar di pasaran memiliki kualitas yang baik tetapi

tidak dapat digunakan sebagai sampel, karena sampel yang sudah ditetapkan adalah rimpang jahe berasal dari wilayah Temanggung.

2) Pembuatan simplisia

Rimpang yang digunakan telah berusia 9-10 bulan penanaman. Setelah rimpang dikumpulkan kemudian dicuci dengan air mengalir supaya terpisahkan dari tanah yang masih menempel. Setelah itu disortasi untuk memilih rimpang yang baik dan dapat digunakan. kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, barulah dirajang tipis-tipis untuk memudahkan proses pengeringan berikutnya. Proses pengeringan pertama dilakukan dibawah terik matahari, sampel dilindungi menggunakan kain hitam untuk mencegah rimpang kehilangan senyawa. Setelah berkurang kadar airnya, dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan oven. Pengeringan dengan oven menggunakan suhu 50° C hingga benar-benar kering, waktu pengeringan bervariasi tergantung kondisi atau tingkat basah sampel saat masuk ke oven (Abeysekera et al., 2005). Kemudian dilakukan sortasi kering untuk memisahkan kotoran dengan sampel. Proses berikutnya yaitu penghalusan sampel dengan alat *blender*. Setelah sampel halus, kemudian disaring atau diayak dengan mesh no 40. hasil penyaringan kemudian ditimbang.

b. Pembuatan Ekstrak

1) Metode maserasi

Simplisia yang telah diserbuk kemudian ditimbang masing-masing sebanyak 100 gram. Simplisia jahe emprit dimaserasi dengan pelarut etanol 96 % dan etanol 70%) sebanyak 500 ml (perbandingan simplisia dan pelarut 1:5). Simplisia dimasukkan kedalam bejana maserasi kemudian direndam dengan pelarut (Allium et al., 2020). Proses maserasi selama 3×24 jam dengan pengadukan setiap 8 jam sekali. Setiap selesai dilakukan pengadukan tutup kembali bejana serapat mungkin dan tutup bejana dengan kain berwarna hitam untuk melindungi senyawa flavonoid yang bersifat sensitif terhadap cahaya. Setelah proses maserasi selesai, dilakukan penyaringan menggunakan kertas penyaring (Mubarak et al., 2018).

Hasil filtrat yang didapat masih bercampur dengan pelarut sehingga dilakukan penguapan dengan bantuan alat *rotary evaporator* dalam suhu 50° dan dengan pengaturan 50 rpm. Untuk mendapatkan ekstrak yang benar-benar kental maka perlu penguapan lebih lanjut menggunakan waterbath dengan suhu 50°C hingga ekstrak mengental. Proses pengentalan selesai ditandai dengan diperoleh bobot ekstrak yang konstan (Winingsih, 2008).

2) Metode remaserasi

Remaserasi diawali dengan proses perendaman simplisia menggunakan pelarut dengan perbandingan 1:5. Setelah selesai proses penyarian pertama dalam waktu 3x24 jam, dilanjutkan perendaman kedua dengan jumlah pelarut yang sama dan pada simplisia yang sama pula dengan proses pertama. Proses penyarian ini berlangsung 1x24jam. Hal demikian berdasarkan pada sumber yaitu antara serbuk jahe dengan pelarut yang digunakan adalah 1:5 sebanyak 2x proses sehingga total perbandingan simplisia dan pelarut adalah 1:10 (enda, et al., 2011).

Hasil remaserasi disaring untuk mengambil filtrat. Proses berikutnya yaitu pemisahan filtrat dengan pelarut menggunakan *rotary evaporator*. Untuk mengoptimalkan pemisahan filtrat dengan pelarut serta untuk mengurangi kadar air pada ekstrak maka dilakukan penguapan dengan waterbath (Winingsih, 2008).

3. Uji Penetapan Kadar Flavonoid

a. Pembuatan Reagen

1) Pembuatan Larutan Induk Kuersetin 100 ppm

Ambil dan timbang serbuk kuersetin sejumlah 10 mg, lalu larutkan dengan etanol p.a sampai volume 100 ml.

2) Pembuatan Pereaksi $AlCl_3$ 10%

Sebanyak 1 gram $AlCl_3$ kemudian larutkan dengan aquadest hingga 10 ml.

3) Pembuatan Larutan Asam Asetat 5 %

Sejumlah 5 ml asam asetat ditambahkan aquadest hingga 100 ml (Kumalasari et al., 2018).

b. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum dalam Larutan Standar Kuersetin

Pengukuran panjang gelombang maksimum kuersetin diawali dengan pembuatan larutan baku kuersetin 1000 ppm dengan menimbang 25 mg kuersetin dilarutkan ke dalam 25 ml etanol. Kemudian dibuat dari larutan 1000 ppm menjadi 400 ppm dengan cara dipipet 4 ml dari larutan awal, lalu ditambahkan etanol kedalam labu sebanyak 10 ml.

Dari larutan 400 ppm diambil dan ditambahkan AlCl_3 10% masing-masing 1 ml di dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan asam asetat 5% sebanyak 8 ml. Pembacaan dilakukan dengan rentang panjang gelombang 350-500 nm menggunakan spektro UV-Vis (Sudewi & Pontoh, 2018).

c. Penentuan Operating Time Kuersetin

Prosedur penentuan waktu pengoperasian atau *operating time* kuersetin cara diambil larutan kuersetin 1 ml dari larutan 100 ppm, lalu masukan ke tabung reaksi yang kemudian ditambah AlCl_3 10% sebanyak 1 ml. Selanjutnya ditambah asam asetat 5% sebanyak 8 ml dan kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah didapat dengan interval waktu 1 menit hingga tercapai kestabilan dari absorbansi (Sudewi & Pontoh, 2018).

d. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Dari baku kuersetin 1000 ppm kemudian diencerkan menjadi seri larutan kadar 40, 50, 60, 70 dan 80 ppm, lalu pipet 1 ml, kemudian ditambahkan 1 ml aluminium klorida 10%, larutan asam asetat 5% sebanyak 8ml ml. Kemudian diinkubasi selama waktu pengoperasian, absorbansi dari larutan yang diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis *lamda maksimum* (Trinovita et al., 2019).

e. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Ekstrak etanol sampel jahe emprit dibuat larutan konsentrasi 1000 ppm, kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 100 ppm dalam labu ukur 10ml. Larutan tersebut diambil 1mL lalu ditambahkan sejumlah 1 ml serta asam asetat 5% sebanyak 8ml. Kemudian diinkubasi selama waktu pengoperasian dalam temperatur kamar lalu dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang maksimum. Proses tersebut dilakukan sebanyak 2x pengulangan (Kumalasari et al., 2018).

4. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Jahe

a. Pembuatan Larutan Baku DPPH

Baku DPPH 0,4 mM dibuat dengan prosedur menimbang 0,0039 g serbuk DPPH dilarutkan dengan etanol p.a ke dalam labu ukur 25 mL hingga tanda, digojok hingga terlarut sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 0,4 mM (Susiloningrum & Sari, 2021).

b. Optimasi Panjang Gelombang DPPH.

Penentuan *lamda maks* DPPH dilakukan dengan prosedur, dari larutan induk DPPH diambil sejumlah 1 mL dalam kemudian ambil

etanol p.a untuk ditambahkan sampai tanda batas dalam labu ukur 5 mL. absorbansi diukur dengan Spektrofotometri UV-Vis dalam rentang panjang gelombang 400-800 nm (Susiloningrum & Sari, 2021).

c. Pembuatan Larutan Blanko

Cara pembuatan larutan blanko yakni dengan menambahkan 1mL larutan DPPH yang kemudian ditambahkan dengan 4mL etanol pa di dalam labu ukur 5mL, kemudian didiamkan selama waktu pengoperasian ditempat gelap. Serapan larutan diukur dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Susiloningrum & Sari, 2021).

d. Penentuan Operating Time

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara, 1 mL baku DPPH 0,4 mM lalu ditambahkan etanol p.a hingga tanda pada dalam labu 5mL. Lalu dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan pada interval waktu 1 menit dalam durasi 0-30 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Susiloningrum & Sari, 2021).

e. Pengujian Larutan Pembanding Kuersetin/Kontrol Positif

Larutan kuersetin dibuat konsentrasi 100ppm dengan mengambil 10mg kuersetin dibuat larutan sebanyak 100ml dengan etanol pa yang kemudian dijadikan seri dengan kadar 1, 2, 3, 4 serta 5 ppm (Susiloningrum & Sari, 2021).

f. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji 100 ppm dibuat dengan melarutkan 10mg ekstrak dari masing-masing perlakuan, dalam 100 ml etanol pa. Lalu diencerkan menjadi larutan seri kadar 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm.

g. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Jahe Emprit

Masing-masing larutan ekstrak dan pembanding diambil 1ml dari larutan seri, masukkan dalam labu ukur 5ml, lalu ditambahkan 1ml larutan DPPH dan ditambahkan ad tanda batas dengan etanol pa. Setelah larutan diinkubasi selama masa *operating time* maka dilanjutkan dengan serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang maksimal.

G. Analisis data

Untuk menentukan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak jahe emprit, hasil pengujian yakni data seri konsentrasi yang dibuat dari hasil baku pembanding untuk flavonoid total dan aktivitas antioksidan, lalu dihitung persamaan kurva baku. Persamaan kurva baku $y = bx + a$, dimana $y =$ absorbansi dalam nm, $x =$ kadar dalam ppm (mg/L). Absorbansi ekstrak jahe emprit yang dihasilkan kemudian dimasukkan ke persamaan kurva baku sehingga diperoleh kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak jahe emprit. Hasil penetapan kadar flavonoid total serta aktivitas antioksidan ekstrak jahe emprit dianalisa secara statistik ANOVA dan disajikan dalam bentuk tabel maupun bentuk lainnya.

