

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian yang dilakukan menggunakan metode eksperimental laboratorium. Penelitian ini menggunakan sampel jahe merah (*Zingiber officinale var. rubrum*) yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan 3 jenis pelarut yaitu etanol 96%, n-heksan, dan etil asetat. Hasil ekstrak kental dari ketiga larutan tersebut diuji kadar flavonoid dengan kuersetin sebagai larutan pembanding dan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode ABTS (*2,2-Azinobis (3-Etilbenzotiazolin)-6-Asam Sulfonat*).

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

##### **1. Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2021- Februari 2022

##### **2. Lokasi Penelitian**

- a. Determinasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Ekologi dan Biosistem Fakultas Sains dan Matematika Biologi Universitas Diponegoro Semarang
- b. Pembuatan rimpang jahe menjadi ekstrak kental dengan metode maserasi dan variasi pelarut dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

- c. Pengukuran kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var. rubrum*) dilakukan di Laboratorium Analisis Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

### **C. Definisi Operasional**

Definisi operasional dalam penelitian ekperimental laboratorium ini adalah :

1. Rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var. rubrum*) merupakan tanaman temu- temuan yang diperoleh dari Temanggung, Jawa tengah yang menjadi tempat tumbuh dari jahe merah tersebut. Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam jahe merah yang berpotensi sebagai antioksidan alami.
2. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi dingin yang digunakan pada penelitian eksperimental laboratorium ini dengan menggunakan tiga jenis pelarut selama 4 hari (4 x 24 jam)
3. Uji kualitatif adalah uji yang dilakukan dengan penambahan reagen serbuk Mg dan larutan HCl pekat untuk mengidentifikasi senyawa kimia yang terdapat pada sampel yang ditandai dengan adanya perubahan warna jingga hingga coklat.
4. Uji kuantitatif untuk mengidentifikasi kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

5. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS yang ditandai dengan adanya penurunan intensitas warna

#### **D. Variabel Penelitian**

##### **1. Variabel bebas**

Variabel bebas dalam penelitian eksperimental ini adalah variasi pelarut pada metode ekstraksi maserasi rimpang jahe merah dengan menggunakan etanol 96%, etil asetat, n-heksan

##### **2. Variabel terikat**

Variabel terikat dalam penelitian eksperimental ini adalah penentuan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dengan metode ABTS (*2,2-Azinobis (3-Etilbenzotiazolin)-6-Asam Sulfonat*) ekstrak jahe merah

##### **3. Variabel terkendali**

Variabel terkendali dalam penelitian eksperimental ini adalah sebagai berikut:

- a. Jumlah ekstrak rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var. rubrum*)
- b. Waktu maserasi dan suhu pembuatan ekstrak rimpang jahe merah
- c. Deret konsentrasi pada proses pengujian kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak rimpang jahe merah
- d. Waktu penentuan *operating time* dilakukan selama 30 menit

## E. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Seperangkat alat maserasi, batang pengaduk, kertas saring, gelas ukur, Erlenmeyer, cawan penguap, neraca analitik OHAUS, *rotary evaporator* RE-2000E, *waterbath Memmert*. Alat untuk uji kuantitatif flavonoid dan aktivitas antioksidan meliputi labu takar, *beaker glass*, tabung reaksi, pipet ukur, pipet volume, spatula, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800)

### 2. Bahan

Rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var. rubrum*) yang diperoleh dari Temanggung, Jawa Tengah, etanol 96%, etil asetat, *n*-heksan PT. Anugrah, etanol (p.a) PT. SMART-LAB Indonesia, methanol (p.a), kuersetin, aluminium klorida, magnesium CV. Bani Usaha mandiri, asam klorida (HCl), asam asetat PT. Putra Kencana, ABTS,  $K_2S_2O_8$  dari *Sigma Aldrich*®

## F. Prosedur Penelitian

### 1. Determinasi Tanaman Jahe Merah (*Zingiber officinale var. rubrum*)

Rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var. rubrum*) diperoleh pada bulan November di Temanggung, Jawa Tengah. Sampel tanaman kemudian dilakukan determinasi di Laboratorium

Ekologi dan Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Biologi  
Universitas Diponegoro Semarang.

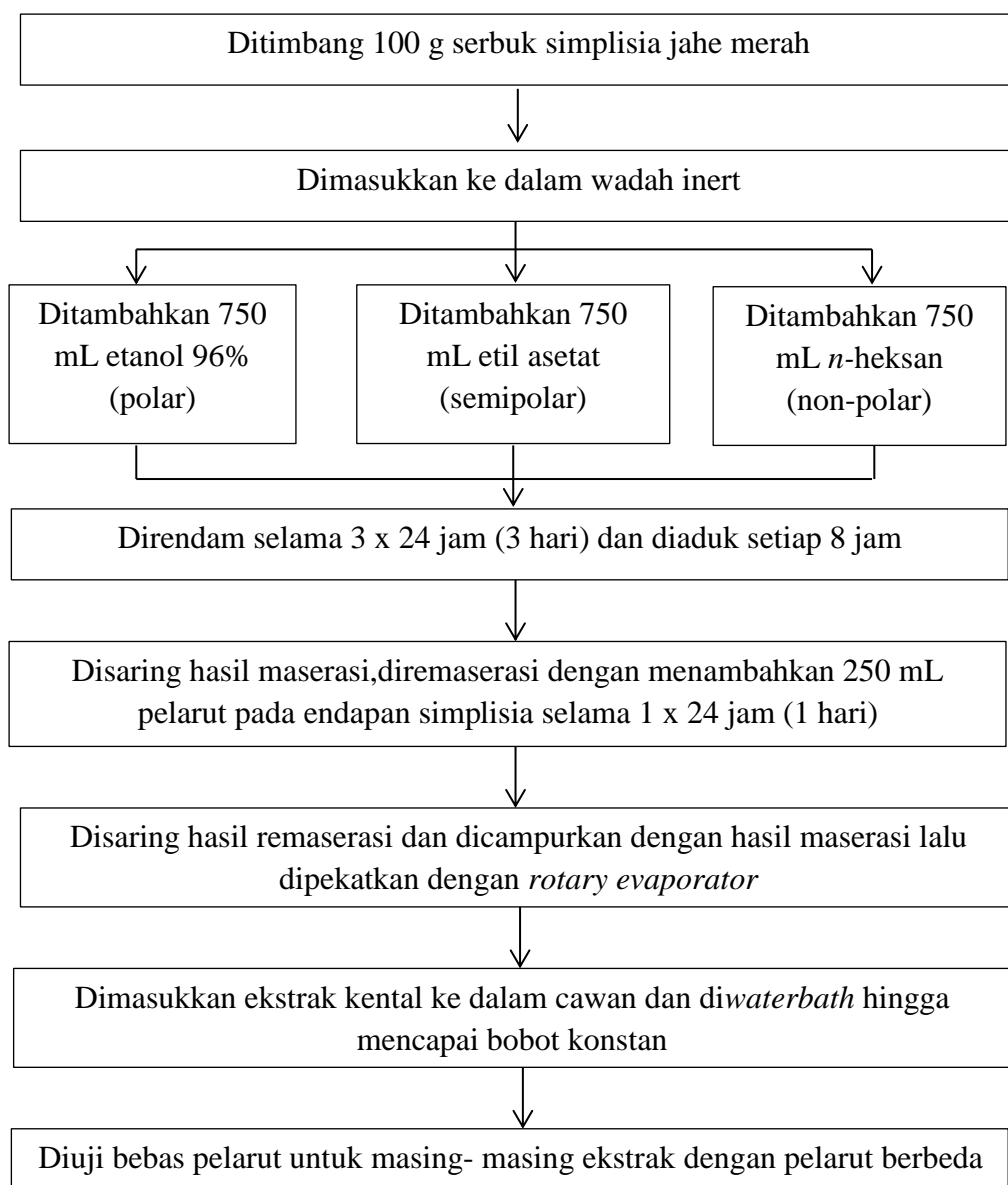
## **2. Pembuatan Simplisia**

Pembuatan simplisia jahe merah (*Zingiber officinale var. rubrum*) diawali dengan sortasi basah untuk memilih jahe merah yang segar dan dalam kondisi yang baik. Kemudian jahe merah dicuci dengan air mengalir dan dibersihkan dari pengotor kemudian ditiriskan, selanjutnya jahe merah dirajang tipis yang bertujuan untuk mempercepat proses pengeringan. Jahe merah yang telah dirajang dikeringkan di bawah sinar matahari dengan kain hitam digunakan sebagai penutup. Setelah itu, jahe merah dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu 50<sup>0</sup>C agar didapatkan simplisia yang kering. Simplisia kering kemudian dilakukan sortasi kering yang bertujuan untuk memisahkan simplisia dengan pengotor yang ada selama proses pengeringan. Simplisia yang digunakan kemudian diblender agar terbentuk serbuk dan diayak dengan ayakan *mesh* no.40. Kemudian serbuk disimpan dalam wadah kering dan tertutup (Puspitasari et al, 2019)

## **3. Pembuatan Ekstrak Etanol 96%, Etil Asetat, dan N-heksan Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale var. rubrum*)**

Pembuatan ekstrak jahe merah pada penelitian ini menggunakan metode ekstraksi dingin, yaitu maserasi. Maserasi merupakan metode dimana sampel serbuk jahe merah dimasukkan ke

dalam wadah inert tertutup rapat yang berisi pelarut (Mukhriani, 2014). Penelitian ini menggunakan tiga jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda yaitu etanol 96% (polar), etil asetat (semipolar), dan *n*-heksan (non-polar). Proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan serbuk simplisia dan pelarut dengan perbandingan 1:10 (100 g : 1 L) selama 4 x 24 jam (4 hari). Pada saat proses maserasi dilakukan pengadukan selama 8 jam sekali yang bertujuan untuk menarik senyawa yang ada pada simplisia secara optimal. Hasil maserasi kemudian disaring dengan kertas saring dan filtrat yang diperoleh diuapkan di dalam *rotary evaporator* dengan suhu yang sesuai dengan titik didih pelarut agar didapatkan ekstrak yang lebih kental (Rahmadani, Sa'diah and Wardatun, 2012). Kemudian ekstrak di *waterbath* dengan suhu 65<sup>0</sup>C hingga mencapai suhu konstan. Selanjutnya dilakukan uji bebas pelarut untuk ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan *n*-heksan.



#### 4. Identifikasi Flavonoid Total Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale var. rubrum*) dengan Pembanding Kuersetin

##### a. Uji kualitatif flavonoid ekstrak jahe merah

Uji kualitatif flavonoid bertujuan untuk menganalisis ada tidaknya senyawa flavonoid yang terkandung di dalam ekstrak jahe merah menggunakan uji warna dimana ditandai dengan perubahan warna

merah, kuning, orange, dan kuning kecoklatan pada ekstrak setelah direaksikan dengan serbuk Mg dan asam klorida (HCl) pekat (Kemit et al, 2015).

b. Uji kuantitatif flavonoid total ekstrak jahe merah

Uji kuantitatif flavonoid total ekstrak jahe merah mengacu pada penelitian Asmorowati & Lindawati (2019) dengan beberapa perubahan pada penimbangan sampel dan konsentrasi yang digunakan.

1) Pembuatan larutan baku induk kuersetin 100 ppm

Serbuk kuersetin sebanyak 10 mg ditimbang untuk membuat baku standar kuersetin dan dilarutkan dengan etanol p.a sampai 100 mL dalam labu takar 100 mL.

2) Pembuatan larutan baku kerja kuersetin 50 ppm

Larutan baku induk kuersetin 100ppm diambil sebanyak 5 mL kemudian ditambahkan sampai 10 mL etanol p.a dalam labu takar 10 mL.

3) Pembuatan larutan blangko

Sebanyak 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5% dipipet dan dicukupkan sampai 10 mL etanol p.a dalam labu takar 10 mL.

4) Penentuan panjang gelombang maksimum ( $\lambda$  maks) kuersetin



Larutan baku kerja kuersetin konsentrasi 50 ppm diambil sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan asam asetat 5% sebanyak 8 mL dalam labu takar 10 mL. Pembacaan panjang gelombang 3 pada rentang 50-550 nm. Hasil panjang gelombang maksimum yang diperoleh digunakan untuk mengukur serapan dari sampel ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan *n*-heksan jahe merah (*Zingiber officinale var. rubrum*)

5) Penentuan *operating time*

Larutan baku kerja kuersetin konsentrasi 50 ppm diambil sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan asam asetat 5% sebanyak 8 mL dalam labu takar 10 mL. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (Ipandi et al., 2016) dengan interval waktu 1 menit hingga absorbansi stabil.

6) Pembuatan kurva baku kuersetin

Pada kurva baku kuersetin dibuat 5 deret konsentrasi yaitu 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, dan 90 ppm. Larutan baku induk kuersetin 100 ppm dipipet sebanyak 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, dan 9 mL kemudian dicukupkan dengan etanol p.a sampai 10 mL dalam labu takar sehingga diperoleh deret konsentrasi 50 ppm sampai 90 ppm. Selanjutnya, dari masing- masing seri konsentrasi dipipet

sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5% kemudian didiamkan selama *operating time*. Setelah itu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV- Vis dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh.

- 7) Penetapan kadar flavonoid ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan *n*-heksan jahe merah (*Zingiber officinale var. rubrum*) Ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan *n*-heksan jahe merah ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam etanol p.a sampai 10 mL dalam labu takar. Kemudian larutan tersebut dipipet sebanyak 7 mL dan dicukupkan volumenya sampai 10 mL dalam labu takar sehingga diperoleh konsentrasi 700 ppm. Selanjutnya dipipet sebanyak 1 mL larutan sampel 700 ppm ditambahkan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5% dalam labu takar 10 mL. Absorbansi sampel diukur menggunakan spektrofotometer UV- Vis dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh.

**5. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale var. rubrum*) dengan Metode ABTS (2,2-Azinobis (3-Etilbenzotiazolin)-6-Asam Sulfonat)**

- a. Pembuatan larutan ABTS (2,2-Azinobis (3-Etilbenzotiazolin)-6-Asam Sulfonat)

Pembuatan larutan ABTS mengacu pada penelitian Mistriyani, et al (2018) dengan modifikasi pada penambahan methanol p.a

- 1) Serbuk ABTS 36 mg dilarutkan dengan 10 mL akuades. Kemudian diinkubasi dalam ruang gelap selama 12 jam.
- 2) Serbuk 5,4 mg  $K_2S_2O_8$ , dilarutkan dengan 10 mL akuades. Kemudian diinkubasi dalam ruang gelap selama 12 jam.
- 3) Kedua larutan diatas dicampur dalam labu takar dan ditambahkan volumenya dengan methanol p.a sampai 50 mL di dalam ruang gelap.

- b. Penentuan panjang gelombang maksimum ( $\lambda$  maks) ABTS (*2,2-Azinobis (3-Etilbenzotiazolin)-6-Asam Sulfonat*)

Larutan ABTS yang telah dibuat kemudian diukur panjang gelombang dengan rentang 700-800 nm. Hasil panjang gelombang maksimum yang diperoleh digunakan untuk mengukur serapan dari sampel ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan *n*-heksan jahe merah (*Zingiber officinale var. rubrum*)

- c. Penentuan *operating time*

Larutan ABTS diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan pada saat penentuan (Fitriana et al, 2015).

- d. Pengukuran aktivitas antioksidan kontrol positif kuersetin

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan larutan pembanding atau kontrol positif kuersetin dengan konsentrasi

larutan induk yang dibuat adalah 100 ppm dengan deret konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm (Hafiz *et al.*, 2020). Sebanyak 3 mL larutan ABTS dimasukkan ke dalam labu ukur dan dicukupkan dengan seri konsentrasi larutan kontrol positif sampai 5 mL. Larutan didiamkan selama waktu *operating time* dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum. Kemudian dihitung % inhibisi dan nilai  $IC_{50}$  pada kontrol positif kuersetin.

- e. Pengukuran aktivitas antioksidan sampel ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan *n*-heksan jahe merah (*Zingiber officinale var. rubrum*)

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan pada larutan sampel ekstrak dengan konsentrasi larutan induk masing-masing ekstrak yang dibuat adalah 100 ppm dan deret konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm (Hafiz *et al.*, 2020). Sebanyak 3 mL larutan ABTS dimasukkan ke dalam labu ukur dan dicukupkan dengan seri konsentrasi larutan kontrol positif sampai 5 mL. Larutan didiamkan selama beberapa waktu dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum. Kemudian dihitung % inhibisi dan nilai  $IC_{50}$  pada masing-masing sampel.

## G. Analisa Data

### 1. Perhitungan rendemen

Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dihitung rendemennya dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{bobot yang diperoleh}}{\text{bobot bahan awal}} \times 100\%$$

### 2. Persamaan regresi linier

Kadar flavonoid yang dilakukan pada penelitian ini dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear dengan persamaan yaitu :

$$Y = bx + a$$

Keterangan :

Y = absorbansi

b = slope

x = konsentrasi (ppm)

a = intersep

Hasil absorbansi dari pengukura sampel dimasukkan ke dalam regresi linier. Absorbansi yaitu y, sehingga kadar flavonoid total diperoleh dinyatakan sebagai jumlah mg ekuivalen kuersetin pada tiap gram ekstrak dari masing- masing pelarut :

$$\text{Kadar flavonoid total (mg/100gr)} = \frac{\text{konsentrasi x volume sampel}}{\text{berat sampel}} \times Fp$$

### 3. aktivitas antioksidan

Pengukuran presentase aktivitas antioksidan dihitung dengan rumus sebagai berikut :

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

Keterangan :

Abs kontrol = absorbansi larutan radikal ABTS

Abs sampel = absorbansi larutan sampel yang telah ditambah radikal ABTS

### 4. Uji statistik

Uji dengan metode statistik menggunakan SPSS 16 untuk menganalisis data pada hasil perhitungan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan pada ekstrak jahe merah dengan tiga jenis pelarut berbeda. Uji statistik yang dilakukan adalah sebagai berikut :

- a. Uji normalitas
- b. Uji homogenitas
- c. Uji kruskal- wallis dan *post hoc*
- d. Uji korelasi linier (Korelasi pearson)

Kategori yang dapat digunakan untuk uji korelasi linier menggunakan uji korelasi pearson adalah seperti tabel 3.1

Berikut :

**Tabel 3.1 Kategori koefisien linier uji korelasi pearson**  
(*sumber : statistik-korelasi*)

<b>Interval nilai <math>r</math></b>	<b>Tingkat hubungan</b>
$0 \leq r < 0,2$	Sangat rendah
$0,2 \leq r < 0,4$	Rendah
$0,4 \leq r < 0,6$	Sedang
$0,6 \leq r < 0,8$	Kuat
$0,8 \leq r \leq 1$	Sangat Kuat