

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Gambaran Penelitian**

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental laboratorium yaitu melihat pengaruh variasi pelarut terhadap kadar flavonoid dan menentukan uji aktivitas antioksidan pada jahe emprit (*zingiber officinale* var. *amarum*) menggunakan metode ABTS (2,2'-azino-bis(3etilbenzotiazolin)-6-asamsulfonat). Metode ini dipilih karena memiliki keunggulan memberikan absorbansi spesifik pada panjang gelombang visibel dan waktu reaksi yang lebih cepat. Selain itu metode ABTS dapat dilarutkan dengan pelarut organik maupun air sehingga bisa mendeteksi senyawa yang bersifat lipofilik maupun hidrofilik (Amin *et al.*, 2021)

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

##### 1. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2021 – Februari 2022

##### 2. Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan

- a. Laboratorium Instrumen Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran untuk melakukan pengujian kandungan zat flavonoid ekstrak jahe emprit (*Zingiber officinale* var. *amarum*) dan uji antioksidan

- b. menggunakan metode ABTS (*2,2'-azino-bis(3etilbenzotiazolin)-6-asamsulfonat*) dengan variasi pelarut.
- c. Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo untuk melakukan proses pembuatan ekstrak jahe emprit.
- d. Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro untuk melakukan determinasi tanaman.

### **C. Variabel Penelitian**

#### 1. Variabel Bebas

Variabel yang terdapat dalam penelitian berpengaruh atau mempengaruhi variabel tergantung. Penelitian ini variabel bebasnya adalah variasi pelarut yaitu ethanol 96%, etil asetat, dan n-heksan

#### 2. Variabel Terikat

Variabel yang terdapat dalam penelitian dan keragamannya dipengaruhi oleh variabel lain. Variabel terikat antara lain :

- a. Kadar flavonoid yang terhadap jahe emprit (*Zingiber officinale var.amarrum*)
- b. Nilai IC<sub>50</sub> pada jahe emprit (*Zingiber officinale var.amarum*)

### **D. Prosedur Penelitian**

#### 1. Alat dan Bahan

- a. Alat

Alat yang digunakan yaitu beaker glass 250 ml, tabung reaksi, kompor spiritus, kassa asbes, spektrofotometer UV-Vis, kertas saring whatman no 42, gelas ukur 100 ml, 50 ml, 10 ml cawan uap, timbangan analitik, sarung tangan, corong, kain flanel, *rotary evaporator*, pipet tetes, labu alas bulat 500 ml, pendingin liebig, corong pisah, pengaduk, pengayak 40 mesh, labu ukur 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, blender philip 600W

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sebuk jahe emprit (*Zingiber officinale var.amarum*) dibutuhkan kurang lebih 300 g Sedangkan bahan kimia yang akan digunakan yaitu etanol 96%, N-hexan dan etil asetat, ABTS (Sigma-Aldrich®)  $K_2S_2O_8$ (Merck®), Vitamin C, Asam asetat glasial 5%,  $AlCl_3$  10%, Aquadest, etanol p.a, methanol p.a, kuersetin

## E. Prosedur Kerja

### 1. Pengumpulan Bahan

Jahe Emprit (*Zingiber officinale var.amarum*) yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Temanggung. Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro untuk mengetahui kebenaran dan jenis spesies pada tanaman jahe emprit (*Zingiber officinale var.amarum*) yang akan digunakan pada penelitian ini.

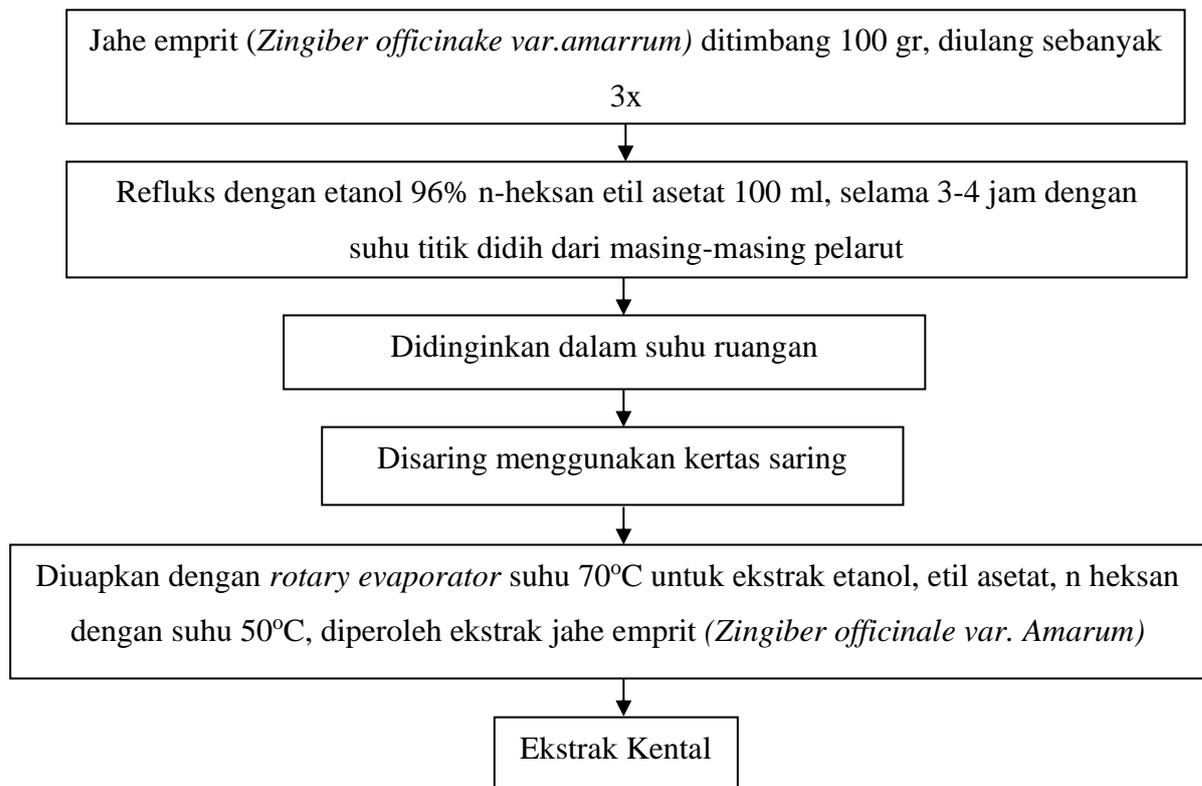
## 2. Penyiapan Bahan

Jahe emprit yang sudah dibeli dicuci bersih menggunakan air mengalir untuk memisahkan tanah yang menempel pada rimpang jahe emprit, selanjutnya ditiriskan terlebih dahulu setelah itu jahe yang sudah dicuci dipotong-potong sesuai ketebalan yang diinginkan dan dikeringkan terlebih dahulu dengan cara diangin-anginkan selama 3 hari setelah itu dikeringkan dengan menggunakan bantuan oven dengan suhu 70° C selama 5 jam, digunakan pada suhu 70°C karena untuk senyawa gingerol kondisi pengerigan yang optimum pada suhu 70°C, dapat diketahui bahwa senyawa gingerol adalah senyawa yang memiliki aktiitas antioksidan (Hafeez *et al.*, 2021) setelah itu simplisia yang telah kering dilakukan sortasi kering dengan melakukan pemisahan antara simplisia dan zat pengotor yang masih tersisa, selanjutnya diblender agar didapatkan serbuk simplisia dilanjutkan dengan pengayakan menggunakan mesh no 40 dan selanjutnya dilakukan uji kadar air simplisia untuk menentukan lama waktu oven pada pembuatan simplisia berikutnya .

### **F. Pembuatan Ekstrak Jahe Emprit (*Zingiber officinale var.Amarum*)**

Pembuatan ekstrak jahe emprit (*Zingiber officinale var.amarum*) menggunakan metode ekstraksi refluks. Serbuk jahe emprit ditimbang sebanyak 100 gram sebanyak tiga kali, kemudian dimasukkan kedalam alas bulat dan menambahkan etanol 96 %, n-heksan, dan etil asetat 200 ml di refluks selama 4 jam dengan suhu titik didih dari masing-masing pelarut yang

digunakan. Hasil dari residu hasil refluks pertama diekstraksi kembali dengan pelarut yang digunakan sebanyak 100 ml dengan perlakuan yang sama (di refluks pada suhu titik didih dari masing-masing pelarut yaitu etnaol 96% dengan titik didih pelarut 78° C, etil asetat 77° C, n-heksan 69° C selama 2 jam). Hasil refluks didinginkan sampai suhu kamar. Hasil refluks dilakukan penyaringan menggunakan kain flanel, sehingga diperoleh filtrat yang jernih, filtrat hasil pemisahan selanjutnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 70° C dengan kecepatan 150 rpm selama 20 menit untuk ekstrak etanol 96%, sedangkan untuk ekstrak etil asetat dan n-heksan menggunakan suhu 50°C dengan kecepatan 150 rpm selama 15 menit digunakan pada suhu tersebut agar ekstrak lebih pekat dan kental selain itu penggunaan pada suhu tersebut juga agar tetap menjaga atau tidak merusak komponen yang terkandung pada larutan sampel.



**Gambar 3.1 Skema Kerja Pembuatan Ekstrak Jahe Emprit  
(*Zingiber officinale* Var.*Amarrum*)**

**G. Uji Kadar Flavonoid Total**

**1. Uji Kualitatif (Uji Warna) Flavonoid**

Uji flavonoid dilakukan dengan cara mereaksikan sampel dengan menggunakan HCl dan serbuk Mg. Flavonoid dikatakan positif jika hasil yang didapatkan menunjukkan perubahan warna menjadi warna merah atau jingga. Asam klorida dan magnesium akan bereaksi membentuk gelembung-gelembung. Fungsi dari larutan magnesium dan HCl yaitu untuk mereduksi inti benzopiron pada struktur flavonoid sehingga akan membentuk warna jingga atau merah kecoklatan (Farida *et al.*, 2021)

**2. Uji Kuantitatif Flavonoid Total**

a. Pembuatan larutan baku quercetin

Quercetin ditimbang 10 mg larutkan dengan etanol hingga 100 ml hingga diperoleh konsentrasi 100 ppm

b. Penentuan *operating time*

Larutan quercetin dengan konsentrasi yang digunakan diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi lalu direaksikan dengan 1 mL larutan AlCl<sub>3</sub> 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Larutan dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimum dengan waktu 30 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

c. Penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimal ditentukan dengan mengambil larutan kuersetin 50 ppm sebanyak 1 mL. Larutan kuersetin pada konsentrasi yang digunakan direaksikan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 ml asam asetat 5% (Vifta *et al.*, 2021). Penentuan panjang gelombang maksimum menggunakan larutan induk quercetin pada range 350-500 nm, digunakan untuk mengukur dari serapan ekstrak (Helmidanora *et al.*, 2020)

d. Penentuan kurva kalibrasi

Larutan seri dibuat dengan bahan quercetin sebagai bahan baku standar dengan konsentrasi 40, 50, 60, 70, dan 80 ppm. Sebanyak 1 mL larutan seri kadar dari tiap-tiap konsenrasi dimasukan dan direaksikan dengan 1 mL  $\text{ALCL}_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5% dan didiamkan selama 30 menit dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dan waktu oprasional.

e. Penentuan flavonoid total

Tiga ekstrak jahe emprit yang sudah diperoleh, ketiganya ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan kedalam 10 mL etanol dan diperoleh konsentrasi 1000 ppm lalu diencerkan menjadi 500 ppm. Selanjutnya larutan 500 ppm yang sudah dipipet 1 mL ditambahkan 1 mL larutan  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5%. Sampel didiamkan selama kurang lebih selama operating time pada suhu kamar selanjutnya dilakukan pengukuran dengan menggunakan

spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang maksimum dan waktu operasional yang telah diperoleh (Vifta *et al.*, 2021) pengujian kadar flavonoid total dari setiap ekstrak dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

TF dihitung dengan rumus pada Persamaan

$$\text{Total Flavonoid} = \frac{c \times V \times fp}{m}$$

Keterangan : c : kesetaraan kuersetin (mg/L)

V : volume sampel (L)

fp : faktor pengenceran

m : massa sampel (g)

TF diinterpretasikan sebagai miligram Quercetin Equivalent per gram dry weight (mg QE/g dw) sampel (Dewi *et al.*, 2018)

## H. Uji Antioksidan dengan metode ABTS

### 1. Pengujian ABTS

#### a. Penentuan Panjang gelombang maksimal larutan ABTS

Larutan ABTS yang sudah dicampurkan dapat diukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 680-800 nm.

#### b. *Operating time* larutan ABTS

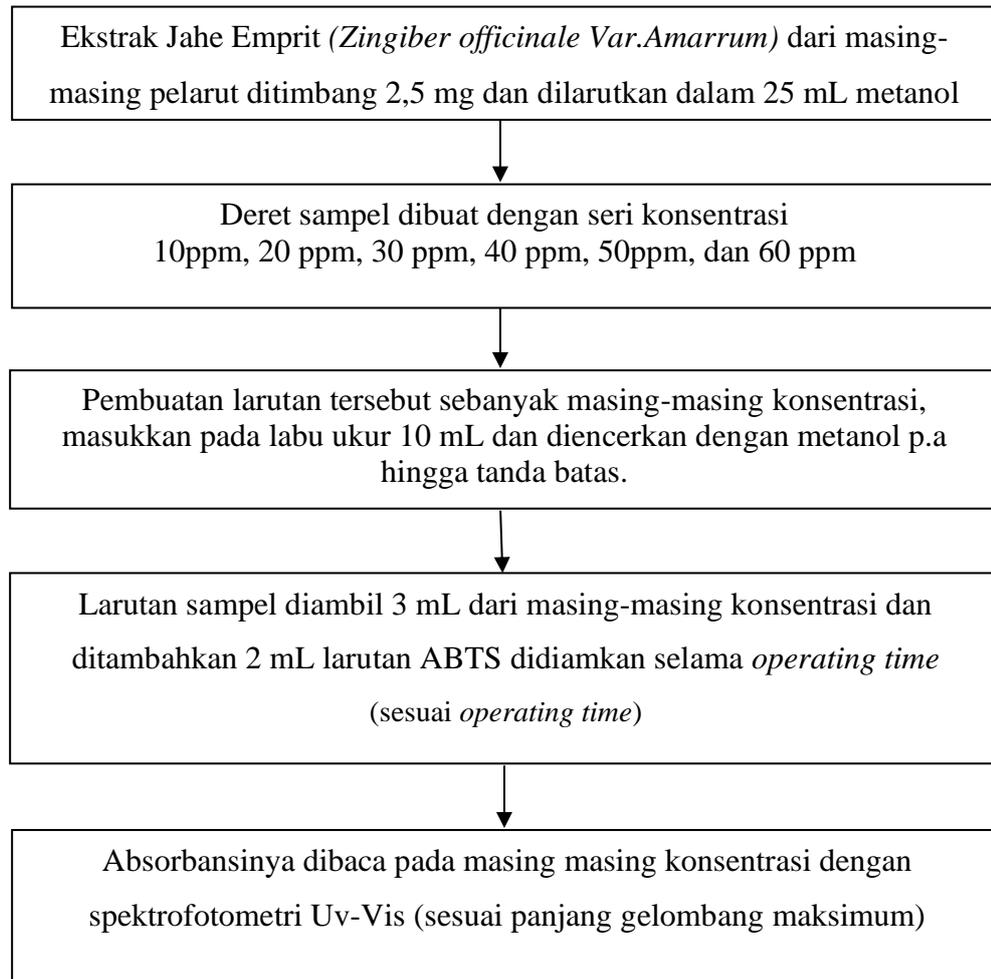
*Operating time* dapat ditentukan dengan cara larutan ABTS+ larutan tersebut dengan divortex 1 menit dan dibaca absorbansinya pada menit ke-1 sampai menit ke-30 menit pada panjang gelombang maksimal.

#### c. Pengujian vitamin C

Sebanyak 2,5 mg vitamin C dilarutkan dalam 25 mL aquadest sehingga diperoleh konsentrasi stok 100 ppm Larutan stok vitamin C 100 ppm, kemudian dipipet masing-masing 0,1 ml, 0,15 ml, 2,5 ml, 0,25 ml, 0,3 ml, 0,35 larutan yang sudah diambil dicukupkan volumenya dengan metanol p.a dalam labu ukur 10 ml sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm, 2,5 ppm, 3 ppm, 3,5 ppm, selanjutnya larutan diambil 3 ml ditambah 2 ml larutan ABTS+ lalu selanjutnya larutan dihomogenkan lalu diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada Panjang gelombang maksimal 739 nm.

d. Penentuan aktivitas antioksidan

Larutan stok 100 ppm disiapkan dengan cara menimbang 2,5 mg masing-masing ekstrak jahe emprit dan dilarutkan dengan metanol p.a sambil dihomogenkan, volume akhir dicukupkan dengan menambahkan metanol p.a sampai 25 mL dalam labu ukur. Larutan stok sampel ekstrak jahe emprit 100 ppm di pipet masing-masing 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml campuran masing-masing dicukupkan volumenya sampai 10 ml dengan metanol p.a selajutnya larutan tersebut diambil 3 ml dan ditambah 2 mL larutan ABTS+ lalu. Campuran didiamkan selama waktu *operating time* selanjutnya dibaca serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang 680-800 nm, (Salampe *et al.*, 2019).



**Gambar 3.2 Skema Kerja Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Jahe Emprit (*Zingiber Officinale* Var.*Amarum*) dengan metode ABTS(2,2'-azino-bis(3etilbenzotiazolin)-6-asamsulfonat)**

## I. Analisis Data

### 1. Uji statistik

Data analisis menggunakan uji statistik SPSS untuk mengetahui perbedaan signifikan pada perbandingan variasi pelarut dengan uji ANOVA kemudian dilanjutkan dengan uji LDC

2. Besarnya persentase pengikatan radikal bebas ABTS dihitung berdasarkan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs Blanko} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Blanko}} \times 100\%$$

Keterangan:

Absorbansi Blanko = Absorbansi tidak mengandung sampel

Absorbansi Sampel = Absorbansi Ekstrak

Nilai  $IC_{50}$  (50% *Inhibitory Concentration*) ditentukan dengan analisis probit dari data log konsentrasi dengan probit persentase pengikatan radikal bebas. Hasil perhitungan % peredaman dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai absis (sumbu x) dan nilai % inhibisi antioksidan sebagai ordinatnya (sumbu y). Nilai  $IC_{50}$  dihitung pada saat nilai % peredaman sebesar 50% dengan menggunakan persamaan:  $y = ax + b$ .