

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni di Laboratorium untuk menganalisa kandungan metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan dari ekstrak kasar dan terpurifikasi daun kencur (*Kaempferia galanga* L.) menggunakan metode DPPH.

B. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a. Determinasi tanaman dibuktikan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Biologi Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Lokasi pembuatan ekstrak kasar dan terpurifikasi daun kencur (*Kaempferia galanga* L.) dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Penelitian pengujian aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Instrumen Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Mei-Agustus 2022.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah daun kencur (*Kaempferia galanga* L.) yang berasal dari Desa Rejosari, Kabupaten Kudus.

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah daun kencur (*Kaempferia galanga L.*) yang digunakan sebanyak 250 gram.

D. Definisi Operasional

1. Metode maserasi adalah suatu proses perendaman serbuk tanaman dengan menggunakan pelarut yang sesuai ke dalam wadah yang tertutup rapat dan pada suhu kamar selama 5 hari.
2. Ekstrak kasar adalah ekstrak yang masih ada zat pengotor yang tidak berkhasiat. Pelarut ekstrak kasar pada penelitian adalah etanol 96%.
3. Ekstrak terpurifikasi adalah ekstrak yang sudah murni atau terbebas dari komponen zat ballast (zat pengotor) seperti klorofil yang bisa mengganggu suatu matriks bahan alam dalam menghasilkan aktivitas biologi. Pelarut yang digunakan untuk ekstrak terpurifikasi adalah n-heksana 100 ml dan etanol 100 ml.
4. Metode DPPH adalah adanya atom hidrogen dari senyawa antioksidan yang berikatan dengan elektron bebas pada senyawa radikal sehingga menyebabkan perubahan dari radikal bebas (diphenylpicrylhydrazyl) menjadi senyawa non-radikal (diphenylpicrylhydrazine).

E. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak kasar dan terpurifikasi daun kencur (*Kaempferia galanga L.*) dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan Ekstrak kasar dan terpurifikasi daun kencur (*Kaempferia galanga L.*) menggunakan metode DPPH yang ditentukan dengan nilai %inhibisi dan IC_{50} .

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah panjang gelombang absorbansi, *operating time* ekstrak kasar dan terpurifikasi daun kencur (*Kaempferia galanga L.*).

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Seperangkat alat instrumen, spektrofotometer UV-Vis, gelas ukur 100 ml, beker glass 500 ml, labu takar 5 ml dan 10 ml, corong kaca, batang pengaduk, kain fanel, blender, timbangan analitik, waterbath, tabung reaksi, pipet ukur, mikropipet, cawan porselen, tanur listrik, *chamber klt*, plat KLT, *Halogen Moisture Analyzer*.

2. Bahan

Daun kencur (*Kampferia galanga L.*), etanol 96% 1,250 ml, n-heksana 800 ml, asam asetat (CH_3COOH) 1 ml, asam sulfat (H_2SO_4) 3 tetes, etil asetat 1 ml, pita Mg, asam klorida pekat (HCl p) 3 tetes, $FeCl_3$ 1% 3 tetes, asam klorida (HCl) 3 tetes, pereaksi meyer 3 tetes, asam asetat

glasial (CH_3COOH glasial) 3 tetes, asam sulfat pekat (H_2SO_4 p) 3 tetes, HCl 2N 3 tetes, DPPH 15,8 mg, etanol *p.a*, dan kuersetin 10 mg.

G. Pengumpulan Data

1. Pembuatan simplisia dan pembuatan ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi daun kencur (*Kampferia galanga* L.)

a. Pembuatan simplisia tanaman daun kencur (*Kaempferia galanga* L.)

Daun kencur (*Kampferia galanga* L.) yang diambil dari Desa Rejosari, Kabupaten Kudus, Jawa Tengah. Daun kencur (*Kampferia galanga* L.) di cuci bersih menggunakan air mengalir untuk menghilangkan debu yang menempel pada daun dan dirajang, kemudian daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka, dibawah matahari secara langsung selama 18 hari dan di oven dengan suhu $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 4 hari. Selanjutnya daun kencur (*Kampferia galanga* L.) dihaluskan dengan blender sampai diperoleh serbuk simplisia dan kemudian diayak menggunakan ayakan nomor 40 Mesh (Syabania *et al.*, 2021).

b. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara serbuk dan ekstrak daun kencur sebanyak 3 gram diletakkan dilempeng aluminium foil (khusus) kemudian dimasukkan kedalam alat *Halogen Moisture Analyzer* yang telah disiapkan pada suhu 105°C selama 10 menit kemudian dicatat hasilnya yang tertera pada *Halogen Moisture*

Analyzer. Dikatakan memenuhi syarat apabila jumlah kadar air yang tertera kurang dari 10% (Sumiati *et al.*, 2019).

a. Penetapan kadar abu

Penetapan kadar abu dilakukan dengan metode gravimetri dengan cara ditimbang 3g simplisia kemudian dimasukkan ke dalam cawan porselen yang sudah diketahui bobotnya, selanjutnya di abukan dalam tanur listrik pada suhu maksimum 600⁰C selama 3 jam sampai pengabuan sempurna (sekali – kali pintu tanur di buka sedikit, agar oksigen bisa masuk) dan di dinginkan kemudian di timbang sampai bobot tetap (Helilusiatiningsih and Soenyoto, 2020).

Perhitungan:

$$\text{Kadar abu} = \frac{W1-W2}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

W =adalah bobot contoh sebelum diabukan (g)

W1 =adalah bobot contoh + cawan sesudah diabukan (g)

W2 =adalah bobot cawan kosong (g)

b. Pembuatan ekstrak etanol daun kencur (*Kaempferia galanga* L.)

Sebanyak 250 gram serbuk simplisia daun kencur dimasukkan dalam bejana maserasi, ditambahkan 1250 ml etanol 96% (1 : 5) dengan sesekali dilakukan pengadukan selama 3 hari kemudian ekstrak yang diperoleh disaring menggunakan kain flanel di pisahkan filtrat dan residunya. Setelah penyaringan maserat pertama, dilakukan remaserasi dimana residu ditambahkan 500 ml etanol 96% (1 : 2)

kemudian di diamkan selama 2 hari kemudian dipisahkan filtrat dan residu. Filtar yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan penguap putar (rotary evaporator) dan waterbath sehingga didapatkan ekstrak kental yang kemudian ekstrak kental yang diperoleh dihitung rendemennya (Andriani and Murtisiwi, 2018).

c. Purifikasi n-heksana daun kencur

Setelah didapatkan ekstrak kasar selanjutnya pemurnian ekstrak dari zat pengotornya, pemurnian dilakukan dengan ekstraksi cair-cair yaitu etanol dengan n-heksana dengan cara ditimbang 10 gram ekstrak yang dilarutkan dengan 100 ml etanol 96% kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 100 ml n-heksana dengan perbandinga (1:1). Selanjutnya corong di kocok dan di diamkan hingga terbentuk 2 lapisan untuk lapisan n-heksana berada di atas. Purifikasi ini diulangi sampai lapisan n-heksana berubah menjadi warna bening, warna bening yang yang dihasilkan menunjukkan sudah tidak ada lagi zat pengotor. Selanjutnya larutan hasil pemisahan di kumpulkan dan di evaporasi sehingga di dapatkan ekstrak terpurifikasi (Luhurningtyas *et al.*, 2021).

d. Perhitungan Rendemen

Perhitungan rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus :

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

e. Pengujian bebas etanol

Pengujian bebas etanol dilakukan dengan cara dimasukkan sampel ke dalam tabung reaksi kemudian ekstrak ditambahkan H_2SO_4 pekat dan 1 ml larutan kalium dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) yang selanjutnya diamati perubahan warna yang terjadi, jika pada larutan ekstrak mengandung etanol maka akan terjadi perubahan warna yang dari jingga menjadi hijau kebiruan (Esati *et al.*, 2021).

f. Uji kemurnian

Uji kemurnian menggunakan KLT dengan menggunakan fase gerak yaitu n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 5:1 yang selanjutnya di analisis di bawah lampu UV λ 254 nm (Sya'diyah *et al.*, 2014).

2. Skrining fitokimia ekstrak kasar dan terpurifikasi

a. Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara sebanyak 50 mg ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi daun kencur yang dilarutkan dengan etanol 96% selanjutnya di ambil 1 ml kemudian di tambahkan dengan serbuk Mg secukupnya dan 3 tetes asam klorida pekat (HCL p). Apabila ekstrak positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna jingga (flavon), merah muda (flavanol), merah (2,3 dihidrioflavanol), dan ungu (xanthine) (Nursyafitri *et al.*, 2021).

b. Fenol

Uji fenol dilakukan dengan cara 50 mg ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi daun kencur dilarutkan kedalam air kemudian direaksikan dengan larutan FeCl_3 1% kemudian diamati perubahan warna yang terjadi jika terdapat perubahan warna hijau kehitaman, biru kehitam maka positif fenol(Habibi *et al.*, 2018).

c. Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara sebanyak 50 mg ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi daun kencur dan ditambahkan 5 mL HCl 2 N kemudian dipanaskan dan di dinginkan, selanjunya di ambil 1 ml untuk tiap-tiap tabung. Pada tabung pertama ditambahn beberapa tetes pereaksi mayer untuk tabung kedua ditambahn pereaksi dragendrof, jika pada pereaksi mayer terdapat endapan putih maka positif alkaloid dan jika pada pereaksi dragendrof terdapat endapan jingga maka positif alkaloid (Muthmainnah, 2019).

d. Terpenoid

Uji terpenoid dilakukan dengan cara sebanyak 0,5 g ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi daun kencur dan ditambahkan 1 ml CH_3COOH glasial dan 1 ml H_2SO_4 pekat, jika terjadi perubahan warna merah maka positif terpenoid (Noviyanty and Linda, 2020).

e. Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara sebanyak 50 mg ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi daun kencur ditambahkan 10 mL air

panas dan didinginkan selanjutnya dikocok kuat-kuat selama 10 detik, jika potitif saponin akan menghasilkan buih yang stabil setelah penambahan 1 tetes HCL 2 N (Muthmainnah, 2019).

3. Pembuatan stok DPPH (0,4 nM)

a. Perhitungan DPPH

Molaritas DPPH yang digunakan 4.10^{-4} M

BM DPPH = 394,32 g/mol

Volume larutan = 100 ml (0,1 L)

Penimbangan DPPH = BM x Volume Larutan x Mortalitas

DPPH = $394,32 \text{ g/mol} \times 0,1 \text{ L} \times 4.10^{-4} \text{ M}$

= $15,77 \times 10^{-3} \text{ g}$

= 15,8 mg

b. Pembuatan larutan stok DPPH

Ditimbang serbuk DPPH sebanyak 15,77 mg yang dimasukkan ke dalam labu takkar 100 ml kemudian dilarutkan dengan etanol *p.a* sampai tepat 100 ml sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 mM. Selanjutnya larutan DPPH disimpan dalam wadah yang dilapisi alumunium foil di almari es sampai dengan dilakukan pengujian (Andriani and Murtisiwi, 2020).

4. Pengujian DPPH

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Diambil sebanyak 1 ml larutan DPPH 0,4 mM dan ditambahkan dengan 4 ml etanol *p.a.* sampai tanda batas pada labu

ukur 5 ml dan dihomogenkan. Selanjutnya didiamkan selama 30 menit ditempat yang gelap kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500-600 nm (Ipand *et al.*, 2016).

b. Penentuan *operating time* DPPH

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara 1 ml larutan DPPH 0,4 mM dan ditambah dengan larutan kuersetin 3 ppm sebanyak 4 mL. Selanjutnya larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval pada waktu 2 menit sampai didapatkan absorbansi yang sudah stabil (Ipand *et al.*, 2016).

5. Pengujian kuersetin sebagai pembanding

Ditimbang kuersetin sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan etanol add 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya dibuat larutan seri dengan kadar 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm. Sebanyak 1 mL larutan standar DPPH 0,4 mM ditambahkan larutan standar kuersetin sampai tanda batas pada labu ukur 5 mL, kemudian didiamkan di tempat gelap dan absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh (Susiloningrum and Sari, 2021).

6. Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi daun kencur (*Kampfreia galanga* L.)

a. Ekstrak kasar daun kencur (*Kaempferia galanga* L.)

Sampel ekstrak kasar daun kencur ditimbang 10 mg dimasukkan dalam labu takar 10 ml dan ditambah pelarut etanol *p.a* 10 ml sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm. Sebanyak 1 mL larutan 0,4 mM DPPH ditambahkan pada tiap-tiap konsentrasi larutan sampel sampai tanda batas pada labu ukur 5 mL. Selanjutnya larutan didiamkan di tempat gelap dan diukur serapan dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh (Susiloningrum and Sari, 2021).

b. Ekstrak terpurifikasi daun kencur (*Kaempferia galanga* L.)

Sampel ekstrak terpurifikasi daun kencur ditimbang 10 mg dimasukkan dalam labu takar 10 ml dan ditambah pelarut etanol *p.a* 10 ml sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm. Sebanyak 1 mL larutan 0,4 mM DPPH ditambahkan pada tiap-tiap konsentrasi larutan sampel sampai tanda batas pada labu ukur 5 mL. Selanjutnya larutan didiamkan di tempat gelap dan diukur serapan dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh (Susiloningrum and Sari, 2021).

H. Analisis Data

Pengujian antioksidan dilakukan replikasi 3 kali, setelah dilakukan pengujian antioksidan data hasil yang diperoleh selanjutnya data dioleh menggunakan *Excel* untuk menghitung nilai IC_{50} dan dianalisis secara statistik parametrik untuk melihat perbedaan aktivitas antioksidan antara ekstrak kasar dan terpurifikasi yang dianalisis menggunakan *Oneway Anova* kemudian dilanjutkan dengan metode *tukey* HSD menggunakan metode SPSS versi 16.