

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian digunakan adalah penelitian eksperimental, yaitu pemanfaatan Jahe Merah dan bunga telang untuk menentukan aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* var Rubrum) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) berdasarkan nilai IC₅₀ dengan menggunakan metode DPPH (1,1- difenil-2-pikrilhidrazil)

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang
- b. Pembuatan ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* var Rubrum) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) dan diuji Fitokimia di laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
- c. Purifikasi ekstrak ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* var Rubrum) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) di laboratorium Kimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
- d. Uji aktivitas antioksidan ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* var Rubrum) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) di laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian akan dilaksanakan pada bulan Desember-Februari 2023

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Jahe Merah (*Zingiber officinale* var *Rubrum*) dari Desa Bancak, Kec. Bancak, Kab. Semarang dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) yang berasal dari Desa Tamanmartani, Kec Kalasan, Kab Sleman Yogyakarta.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* var *Rubrum*) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L)

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* var *Rubrum*) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) dengan variasi perbandingan konsentrasi tertentu. Uji aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* var *Rubrum*) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) dengan menggunakan perbandingan 0:1, 1:0, 1:1, 1:2, 2:1 dan konsentrasi yang digunakan 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm (Vifta *et al.*, 2019).

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah variabel bebas yang diberikan dan ukur untuk menentukan ada tidaknya pengaruh. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Nilai IC_{50} dari kombinasi ekstrak jahe merah dan bunga telang yang menyatakan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH
- b. Kategori nilai IC_{50} dari kombinasi ekstrak jahe merah dan bunga telang

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelian ini adalah waktu maserasi, suhu waterbath, panjang gelombang, absorbansi, *operating time*.

E. Pengumpulan Data

1. Alat

Neraca analitik (OHAUS), *moisture balance* (OHAUS), *rotary evaporator* (RE100-Pro), waterbath (Memmert), corong, pipet tetes, pipet ukur, beaker glass, batang pengaduk, blender (Maspion), mesh ukuran 40, labu takar, spatula, botol kaca, corong pisah (pyrex), spatula, mikropipet (BioHit 100 μ L), spektrofotometer UV-Vis (1900i), aluminium foil, botol kaca, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, labu takar.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu jahe merah dan bunga telang, etanol 96 % (teknis, Bratac), n-heksana (Smartlab), aquades,

serbuk DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$), kuersetin (sigma), etanol p.a, HCl pekat, serbuk magnesium, pereaksi dragendrof, pereaksi mayer, pereaksi $FeCl_3$.

F. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi Jahe Merah (*Zingiber officinale* var Rubrum) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Univeristas Diponegoro Semarang. Hasil deteminasi untuk mengetahui kebenaran jenis atau spesies tanaman (Klau & Hesturini, 2021).

2. Penyiapan bahan dan sortasi

Jahe Merah (*Zingiber officinale* var Rubrum) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) dilakukan sortasi basah terlebih dahulu dicuci dengan air mengalir, setelah disortasi basah dilanjutkan perajangan pada jahe merah dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam. Bunga telang dikeringkan dengan diangin-anginkan. Simplisia jahe merah dan bunga telang dilakukan sortasi kering dengan dilakukan pemisahan antara simplisia dan zat pengotor yang masih tersisa dan selanjunya simplisia diblender agar didapat serbuk simplisia dilanjutkan dengan proses pengayakan dengan ayakan no 40 (Widyanti *et al.*, 2021) selanjutnya dilakukan proses ekstraksi.

3. Uji kadar air simplisia

Sampel ditimbang sebanyak 2 g dengan menggunakan cawan moisture balance. Moisture balance diatur pada suhu 81°C kemudian

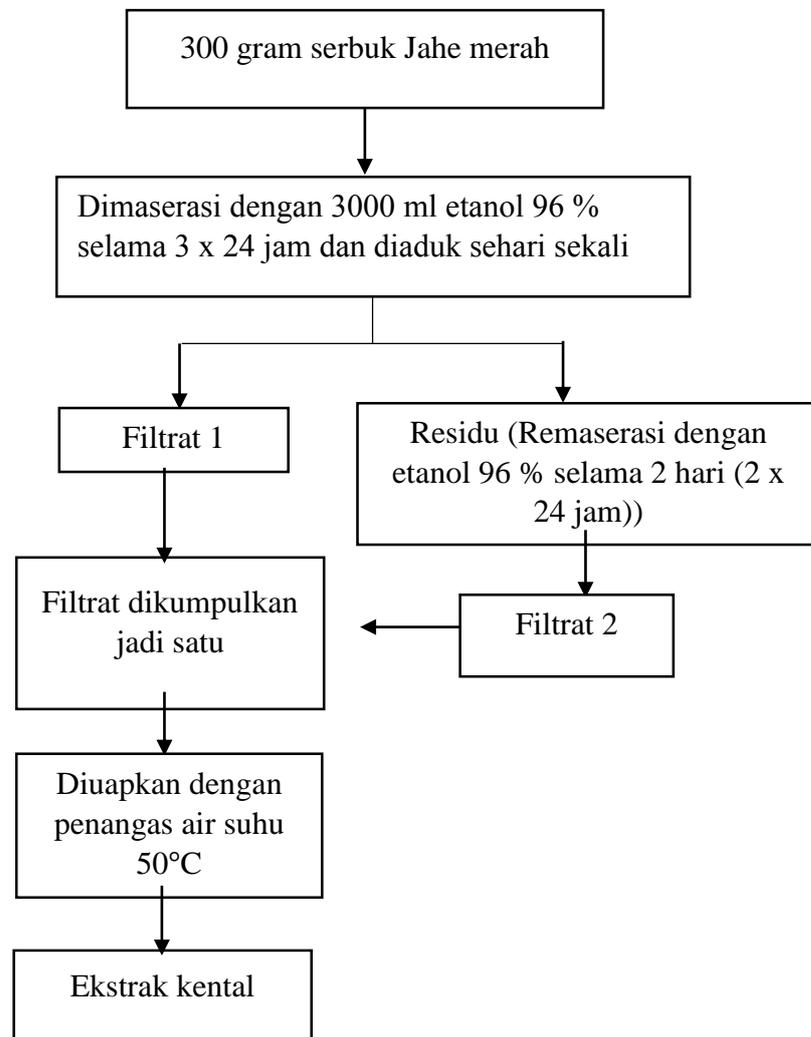
penutup pada moisture balance ditutup dan ditunggu selama beberapa menit hingga muncul hasil kadar airnya (Rukmawati *et al.*, 2017).

4. Pembuatan Ekstrak

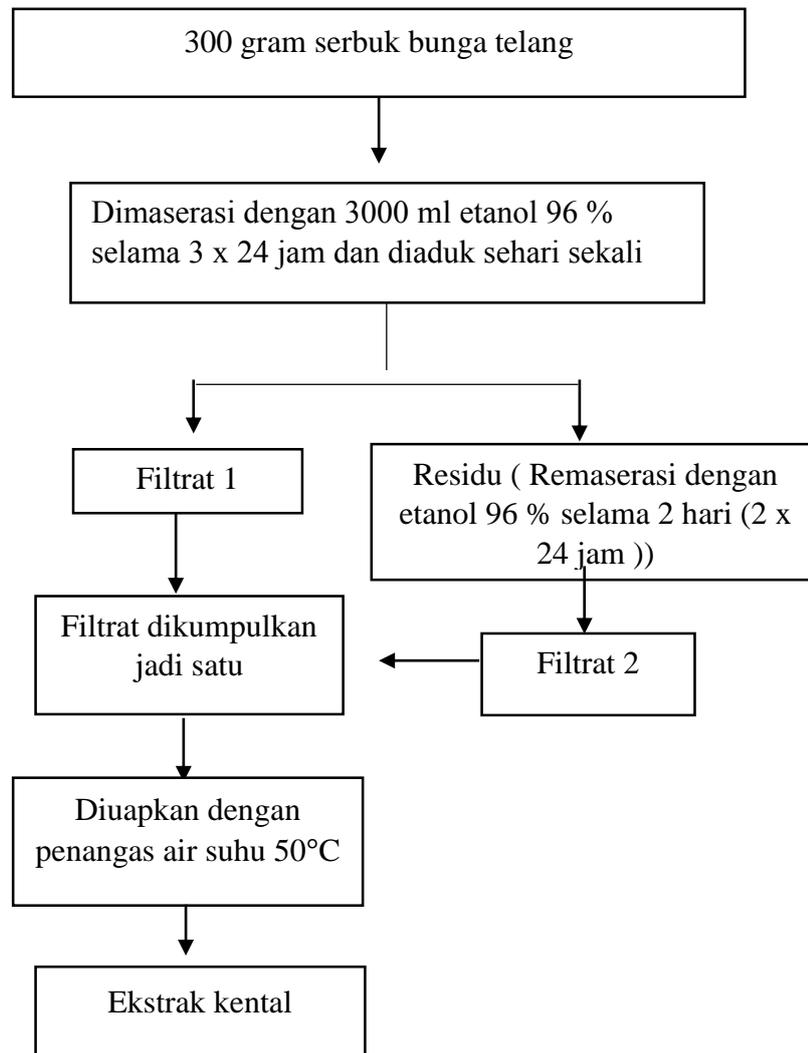
Pembuatan ekstrak kental Bunga Telang dan Jahe Merah dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan cara menimbang serbuk simplisia Jahe Merah dan Bunga Telang masing–masing 300 gram yang telah diblender dan diayak, dilarutkan dalam etanol 96 % pelarut yang digunakan sebanyak 3 L (1 : 10). Maserasi dilakukan selama 3 hari dengan pengadukan sekali sehari dan remaserasi dilakukan selama 2 hari. Kemudian dilakukan penyaringan ekstrak.

Fungsi penyaringan untuk memisahkan filtrat dan residunya. Maserat Jahe dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 78°C sehingga akan diperoleh ekstrak kental (Ofori *et al.*, 2020). Maserat bunga telang yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C lalu ekstrak pekat diuapkan pada *water bath* pada suhu 50°C hingga didapatkan ekstrak kental bunga telang. Ekstrak kental yang didapatkan dihitung rendemen total (Asisdiq *et al.*, 2017) Rendemen dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot Akhir}}{\text{Bobot Awal}} \times 100\%$$



Gambar 3.1 Pembuatan Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* Var Rubrum)



Gambar 3.2 Pembuatan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea L*)

5. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan pada masing-masing ekstrak etanol jahe merah dan bunga telang. Masukkan masing-masing ekstrak kental ke dalam tabung reaksi yang berbeda kemudian ditambahkan dengan 3 tetes pereaksi asam sulfat (H_2SO_4) dan 1 ml pereaksi kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$). Gojog amati perubahan warna ekstrak dikatakan telah bebas etanol bila warna tetap coklat (Astutik and Vifta, 2020).

6. Purifikasi

Purifikasi ekstrak menggunakan variasi pelarut n-heksan (non-polar). Ditimbang ekstrak kental sebanyak 10 gram. Kemudian dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 100 ml, masukkan dalam corong pisah dan ditambahkan pelarut n-heksan 100 ml (1:1) yang digunakan. (Luhurningtyas *et al.*, 2021)

Corong pisah digojog lalu didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan pemisahan. Proses purifikasi dilakukan sampai variasi pelarut yang digunakan dalam purifikasi menjadi bening, yang menunjukkan bahwa sudah tidak ada pengotor (Luhurningtyas *et al.*, 2021). Ekstrak terpurifikasi kemudian diuapkan pada *water bath* dengan suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kental terpurifikasi

7. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia yang bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat pada ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi jahe merah dan bunga telang dilakukan secara kualitatif meliputi uji flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid.

a. Identifikasi Alkaloid

Masing-masing ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 mL. larutran dibagi menjadi dua tabung. Tabung I ditambahkan 3 tetes pereaksi dragendorf, jika terdapat endapan jingga atau merah coklat menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Tabung II ditambahkan 3 tetes pereaksi mayer. Ekstrak ditambahkan reagen Mayer, jika terbentuk

endapan putih menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Palupi *et al.*, 2021)

b. Identifikasi Flavonoid

Ekstrak ditambahkan serbuk Magnesium dan 5 tetes HCl pekat, hasil positif ditandai dengan terbentuk warna merah/kuning (Palupi *et al.*, 2021)

c. Identifikasi Tanin

Ekstrak ditambahkan aquades dan FeCl₃ 1% (Ibrahim *et al.*, 2021). Terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin (Marjoni, 2016)

d. Identifikasi Saponin

Ekstrak ditambahkan 10 mL aquades, kemudian dipanaskan menggunakan bunsen. Larutan dikocok kuat hingga terbentuk buih yang stabil menandakan adanya kandungan saponin (Jamilatur *et al.*, 2019)

8. Penentuan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH

a. Pembuatan larutan stok DPPH

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 5 mg kemudian dilarutkan dalam labu ukur dengan 50 ml etanol p.a sehingga didapatkan konsentrasi 100 ppm. Larutan baku induk DPPH 100 ppm dipipet sebanyak 4 ml, dimasukkan dalam labu ukur 10 ml, kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas, sehingga didapat konsentrasi 40 ppm (Suwarni & Cahyadi, 2016).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Larutan DPPH 40 ppm dipipet sebanyak 2 ml, dimasukkan dalam kuvet dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Sebagai blanko digunakan 2 ml etanol p.a (Suwarni & Cahyadi, 2016).

c. Penentuan *operating time*

Larutan DPPH dipipet sebanyak 2 ml lalu ad sampai 10 ml dengan etanol p.a, dibaca dari menit ke 1-30. Hasil stabil diperoleh pada menit ke 20 (Bakti *et al.*, 2017).

d. Pengujian kuersetin Sebagai Pembanding DPPH

Pembuatan larutan stok 1000 ppm dengan menimbang kuersetin sebanyak 50 mg dan dimasukkan kedalam labu ukur ditambahkan larutan etanol p.a sambil diaduk dan dihomogenkan sampai larut sampai volumenya 50 ml. Lalu dilakukan pengenceran 10 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran untuk membuat konsentrasi 1ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm.

Sebanyak 2 mL masing-masing larutan konsentrasi larutan kuersetin dimasukkan dalam labu ditambahkan 2 ml DPPH, tambahkan etanol p.a hingga tanda batas 10 ml lalu larutan dihomogenkan, kemudian tunggu *operating time* (Erviana *et al.*, 2016).

F. Pengujian Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Jahe Merah dan Bunga Telang

1. Pembuatan Larutan Stok Kombinasi Ekstrak Perbandingan 0:1

Larutan stok pada masing-masing formula yang akan dibuat yaitu 1000 PPM

$$1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{L} = \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}}$$

Jika yang dibutuhkan dalam volume 100 ml, maka penimbangan total ekstrak yang digunakan adalah 100 mg

$$\text{Penimbangan Jahe Merah } \frac{1}{1} \times 100 \text{ mg} = 100 \text{ mg}$$

Penimbangan Bunga Telang : -

2. Pembuatan Larutan Stok Kombinasi Ekstrak Perbandingan 1:0

Penimbangan Jahe Merah : -

$$\text{Penimbangan Bunga Telang } \frac{1}{1} \times 100 \text{ mg} = 100 \text{ mg}$$

3. Pembuatan Larutan Stok kombinasi Ekstrak Perbandingan 1:1

$$\text{Penimbangan Jahe Merah } \frac{1}{2} \times 100 \text{ mg} = 50 \text{ mg}$$

$$\text{Penimbangan Bunga Telang } \frac{1}{2} \times 100 \text{ mg} = 50 \text{ mg}$$

4. Pembuatan Larutan Stok Kombinasi Ekstrak Perbandingan 1:2

$$\text{Penimbangan Jahe Merah } \frac{1}{3} \times 100 \text{ mg} = 33,33 \text{ mg}$$

$$\text{Penimbangan Bunga Telang } : \frac{2}{3} \times 100 \text{ mg} = 66,67 \text{ mg}$$

5. Pembuatan Larutan Stok Kombinasi Ekstrak Perbandingan 2:1

$$\text{Penimbangan Jahe Merah } : \frac{2}{3} \times 100 \text{ mg} = 66,67 \text{ mg}$$

$$\text{Penimbangan Bunga Telang } : \frac{1}{3} \times 100 \text{ mg} = 33,33 \text{ mg}$$

Pengenceran dengan berbagai Konsentrasi yaitu sebesar 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm:

1. $10 \text{ ppm} = \frac{10 \text{ ml} \times 10 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0,1 \text{ ml} = 100 \mu\text{l}$
2. $20 \text{ ppm} = \frac{10 \text{ ml} \times 20 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0,2 \text{ ml} = 200 \mu\text{l}$
3. $30 \text{ ppm} = \frac{10 \text{ ml} \times 30 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0,3 \text{ ml} = 300 \mu\text{l}$
4. $40 \text{ ppm} = \frac{10 \text{ ml} \times 40 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0,4 \text{ ml} = 400 \mu\text{l}$
5. $50 \text{ ppm} = \frac{10 \text{ ml} \times 50 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0,5 \text{ ml} = 500 \mu\text{l}$

Masing–masing larutan diambil 2 ml dimasukkan dalam labu kemudian ditambahkan 2 ml larutan DPPH kemudian ditambahkan etanol p.a hingga 10 ml larutan dihomegenkan. Kemudian didiamkan selama waktu *operating time* yang telah diperoleh dan kemudian diukur absorbansi panjang gelombang maksimum.

G. Analisis Data

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan nilai inhibisi concentration 50 % atau IC_{50} . Perhitungan potensi antioksidan dengan pereaksi DPPH dengan menghitung IC_{50} untuk masing-masing sampel dengan menghitung persentase aktivitas antioksidannya dengan mengurangi nilai absorbansi kontrol dengan nilai absorbansi sampel kemudian dibagi nilai absorbansi kontrol dan dikalikan 100 % (Ulfah, 2019).

Persentase aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi perlakuan}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100 \%$$

Absorbansi kontrol : Absorbansi Larutan DPPH

Absorbansi Perlakuan : Absorbansi kombinasi ekstrak Jahe Merah dan Bunga Telang

Setelah diperoleh persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linier (x,y) untuk mendapatkan nilai IC₅₀ dimana x sebagai konsentrasi (PPM) dan y sebagai persentasi aktivitas (%). IC₅₀ sampel dan pembanding diperoleh dengan rumus:

$$y = bx + a$$

Nilai IC₅₀ didapatkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50

Analisis data statistika menggunakan IBM SPSS Statistics 22 dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) One Way Anova, langkah pertama yakni melakukan uji normalitas yang bertujuan untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis berdistribusi normal atau tidak (Anderha and Maskar, 2021). Uji normalitas dalam penelitian ini menggunakan uji Shapiro-Wilk dikarenakan data yang digunakan kurang dari 50 yaitu 3 kali replikasi dengan taraf uji signifikansi 5% atau 0,05 (Fiqih Sabilillah *et al.*, 2016).

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data yang digunakan dalam analisis telah homogen atau tidak. Untuk data yang telah terdistribusi normal dan homogen selanjutnya diuji One Way Anova. Jika nilai signifikan yang didapatkan >0,05 maka menerima H₀ dan menolak H₁ (Rojihah and lusy, 2015). Untuk uji akhir dilakukan uji posthoc, jika terdapat perbedaan antar kelompok, maka dilanjutkan uji Post Hoc LSD. Apabila menunjukkan signifikansi < 0,05 maka dinyatakan signifikan. (Hariningtyas *et al.*, 2015).